



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

EVALUACIÓN DE PROTEÍNAS
RECOMBINANTES DEL ESTADÍO
ASEXUAL DE *PLASMODIUM SPP.* COMO
NUEVOS MARCADORES DE
SEROPREVALENCIA DE MALARIA EN LA
AMAZONÍA PERUANA

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRA
EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

KATHERINE DANIELA GARRO GAMARRA

LIMA - PERÚ

2019

ASESORA

DRA. KATHERINE TORRES FAJARDO

JURADO EVALUADOR

DRA. ISKRA TUERO OCHOA
PRESIDENTA

DRA. PATRICIA HERRERA VELIT
VOCAL

DR. VICTOR MANUEL NEYRA CHAGUA
SECRETARIO

DEDICATORIA

A mi madre, por su apoyo incondicional.

A Maruja, por su compañía.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, la Dra. Katherine Torres, por su paciencia, apoyo y consejos durante el desarrollo de esta tesis.

A Jason Rosado, por toda su ayuda y asesoría en el análisis de resultados.

A Pamela Rodríguez, por todo su apoyo en el desarrollo experimental de este trabajo.

A Elizabeth Villasis, por sus consejos y acompañamiento durante todo el proceso de esta tesis.

A Beronica Infante, por su apoyo en la coordinación del proyecto.

Al Dr. Victor Neyra y al Laboratorio de Patología del Hospital Cayetano Heredia y al Dr. Gonzalo Domingo y al Laboratorio de Malaria de PATH, por su colaboración en el préstamo de equipos necesarios para llevar a cabo el desarrollo experimental de este trabajo.

Al Dr. Angel Rosas por su colaboración donando proteínas para el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Dionicia Gamboa por su apoyo como líder de nuestro grupo.

A los miembros del jurado, la Dra. Iskra Tuero, la Dra. Patricia Herrera y el Dr. Victor Neyra, por todos sus aportes para mejorar esta tesis.

FINANCIAMIENTO

Los estudios de Maestría fueron financiados por el proyecto “Translational Research Development for Endemic Infectious Diseases of Amazonia”- FOGARTY. Número de proyecto: 2D43TW007120-11A1.

El trabajo experimental fue financiado por el proyecto “Producción y Evaluación de las Proteínas PVMSP10, PVMSP7 y PVMSP8 de *Plasmodium vivax* Y PFMSP10 y PFRH2B de *P. falciparum* como Nuevos Marcadores de Seroprevalencia en la Amazonia Peruana” a través del Convenio N° 218-2015-FONDECYT-DE

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Malaria en el Perú.....	4
2.2. Ciclo de vida de Plasmodium vivax y Plasmodium falciparum.....	5
2.3. Transmisión de la malaria e infecciones asintomáticas en la Amazonía peruana.	7
2.4. Estudios de Seroprevalencia como herramienta para el control de transmisión de la malaria.....	9
2.5. Proteínas del estadio asexual del merozoito.....	11
2.5.1. MSP1, AMA1 y GLURP	12
2.5.2. MSP8.....	13
2.5.3. MSP10.....	14
2.5.4. RH2B	15
2.6. Sistema de expresión de Baculovirus en células de Eucariotas	15
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. HIPOTESIS	20
5. OBJETIVOS	21
5.1. Objetivo general	21
5.2. Objetivos específicos.....	21
6. METODOLOGÍA	22

6.1.	Diseño del estudio	22
6.2.	Población de estudio y muestra	23
6.3.	Proteínas recombinantes	26
6.4.	Determinación de secuencias para la síntesis de las proteínas rPvMSP8 y rPfRH2B y diseño de <i>Primers</i>	27
6.5.	Sistema Baculovirus y expresión eucariota en células de Insecto de las proteínas rPvMSP8 y rPfRH2B.....	28
6.5.1.	Diseño de los plásmidos pFastBacDual con los genes <i>pvmsp8</i> y <i>pfrh2b</i>	28
6.5.2	Clonación de los plásmidos recombinantes pFastBacDual-PvMSP8 y -PfRH2B en <i>Escherichia coli</i> DH5A	29
6.5.3	Transformación de las bacterias “Max Efficiency™ <i>E. coli</i> DH10Bac™”, con los plásmidos recombinantes pFastBacDual-PvMSP8 y -PfRH2B31	
6.5.4	Cultivo en suspensión de células de insecto de <i>Spodoptera frugiperda</i> Sf9	32
6.5.5	Transfección de las células de insecto Sf9 con los bacmidos recombinante para las proteínas PvMSP8 y PfRH2B	33
6.5.6	Amplificación del stock de los Baculovirus recombinantes para las proteínas PvMSP8 y PfRH2B.	35
6.5.7	Cuantificación del stock de Baculovirus recombinante PvMSP8 y PfRH2B	35
6.5.8	Evaluación de la multiplicidad de infección (MOI) y el tiempo de	

infección (TOI) para la expresión de las proteínas recombinantes PvMSP8 y PfrRH2B36	
6.5.9 Escalamiento del sistema de producción y purificación de las proteínas recombinantes PvMSP8 y PfrRH2B.....	37
6.5.10 Concentración y cuantificación de las proteínas recombinantes PvMSP8 y PfrRH2B purificadas a homogeneidad.....	38
6.6 Evaluación de la seroreactividad de proteínas recombinantes PvMSP1, PfmSP1, PvMSP8, PvMSP10, PfmSP10, PfrRH2B, PvAMA1 y PfgLURP mediante ensayos de ELISA.....	39
6.6.1 Estandarización de ensayo de ELISA para las proteínas recombinantes PvMSP1, PfmSP1, PvMSP8, PvMSP10, PfmSP10, PfrRH2B, PvAMA1 y PfgLURP	39
6.6.2 Evaluación de la seroreactividad de proteínas recombinantes PvMSP1, PfmSP1, PvMSP8, PvMSP10, PfmSP10, PfrRH2B, PvAMA1 y PfgLURP mediante ELISA con sueros controles.....	41
6.7 Ensayo LUMINEX multiplex con las proteínas recombinantes PvMSP1, PfmSP1, PvMSP8, PvMSP10, PfmSP10, PfrRH2B, PvAMA1 y PfgLURP ...	43
6.7.1 Unión covalente de las proteínas recombinantes PvMSP1, PfmSP1, PvMSP8, PvMSP10, PfmSP10, PfrRH2B, PvAMA1 y PfgLURP a las perlas magnéticas.....	43
6.7.2 Estandarización de un ensayo Luminex multiplex con las proteínas recombinantes PvMSP1, PfmSP1, PvMSP8, PvMSP10, PfmSP10, PfrRH2B, PvAMA1 y PfgLURP	45
6.7.3 Evaluación de las proteínas recombinantes PvMSP1, PfmSP1,	

PvMSP8, PvMSP10, PfMSP10, PfRH2B, PvAMA1 y PfGLURP como posibles marcadores de transmisión.....	47
6.8 Plan de análisis	48
7. RESULTADOS	49
7.1 Análisis de secuencias de los genes <i>pvmsp8</i> y <i>pfrh2b</i>	49
7.2 Identificación de las secuencias seleccionadas para los genes <i>pvmsp8</i> y <i>pfrh2b</i> en muestras de aislados de parásitos <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i> de la Amazonía peruana	50
7.3 Transformación de bacterias <i>E. coli</i> DH5 α con el plásmido pFastBacDual de las proteínas PvMSP8 y PfRH2B	51
7.4 Obtención del Bácmido recombinante para las proteínas PvMSP8 y PfRH2B en <i>E. coli</i> DH10BAC	53
7.5 Transfección de las células de insecto Sf9 con los bácmidos recombinantes PvMSP8 y PfRH2B y cuantificación de los stocks de Baculovirus recombinante	54
7.6 Expresión, escalamiento de la producción y purificación de las proteínas recombinantes PvMSP8 y PfRH2B.....	55
7.7 Estandarización del ensayo de ELISA para evaluar los niveles de IgG específicos contra las proteínas recombinantes PvMSP8 y PfRH2B.....	57
7.8 Reactividad de anticuerpos IgG contra las proteínas recombinantes mediante ensayos de ELISA.....	61
7.9 Estandarización del ensayo de Luminex® multiplex para la evaluación de anticuerpos IgG específicos contra las proteínas recombinantes	62

7.10	Evaluación de las proteínas recombinantes como marcadores serológicos utilizando Luminex® multiplex	65
7.10.1	Características Socio demográficas.....	65
7.10.2	Determinación de la respuesta serológica IgG específica contra las proteínas recombinantes utilizando Luminex® multiplex.....	67
7.10.3	Cuantificación relativa de anticuerpos IgG contra las proteínas recombinantes	78
8.	DISCUSIÓN	79
8.1	Producción de proteínas recombinantes en un sistema de expresión de Baculovirus.....	79
8.2	Evaluación de proteínas recombinantes como marcadores de seroprevalencia	81
9.	CONCLUSIONES.....	87
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	88
11.	ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°01. Ciclo de vida de *Plasmodium spp.*

Figura N°02. Flujograma de diseño de estudio.

Figura N°03. Área de estudio.

Figura N°04. Amplificación de los genes *pvmsp8* y *pfrh2b* en ADN de aislados de parásitos de la Amazonia peruana.

Figura N°05. Ensayo de Western Blot para la detección de las proteínas recombinantes PfrRH2B y PvMSP8.

Figura N°06. Expresión de las proteínas recombinantes PvMSP8 y PfrRH2B

Figura N°07. Purificación de las proteínas rPvMSP8 y rPfrRH2B.

Figura N°08. Determinación de concentración de antígeno y conjugado para el ensayo de ELISA para rPvMSP8 y rPfrRH2B

Figura N°09. Determinación de concentración de antígeno y conjugado para el ensayo de ELISA para PvMSP1, PvAMA1, PvMSP10, PfMSP1 y PfGLURP.

Figura N°10. Curva de diluciones de sueros negativos y positivos para infección por *P. vivax*

Figura N°11. Curva de diluciones de sueros negativos y positivos para infección por *P. falciparum*.

Figura N°12. Ensayo de ELISA, IgG específicos contra las proteínas recombinantes de *P. vivax* y *P. falciparum*.

Figura N°13. Estandarización del ensayo de Luminex® para la evaluación de IgG específicos contra las proteínas recombinantes

Figura N°14. Diferencias de los niveles de IgG específicos contra las proteínas recombinantes entre las comunidades de Cahuíde y Lupuna.

Figura N°15. Comparación de los niveles de anticuerpos IgG específicos contra las proteínas de *P. vivax* entre individuos expuestos y no expuestos en las comunidades de Cahuíde y Lupuna

Figura N°16. Comparación de los niveles de anticuerpos IgG específica contra las proteínas de *P. falciparum* entre individuos expuestos y no expuestos en las comunidades de Cahuíde y Lupuna .

Figura N°17. Comparación de los niveles de anticuerpos IgG específica contra las proteínas de *P. vivax* entre los grupos etarios en las comunidades de Cahuíde y Lupuna.

Figura N°18. Comparación de los niveles de anticuerpos IgG específica contra las proteínas de *P. falciparum* entre los grupos etarios en las comunidades de Cahuíde y Lupuna

INDICE DE TABLAS

Tabla N°01. Antígenos utilizados para su evaluación como marcadores serológicos

Tabla N°02. Composición de los Buffers para el Sistema de purificación Bio-Scale™ Mini Profinity™ IMAC Cartridges – BioRad

Tabla N°03. Primers diseñados para la amplificación de las tres proteínas de interés

Tabla N°04. Cuantificación por Fluorometría (Qubit, Invitrogen) del ADN de los plásmidos purificados (µg/mL)

Tabla N°05. Características de las poblaciones de estudio y su asociación con la infección por *Plasmodium spp.* evaluado por método de diagnóstico

Tabla N°06. Análisis de regresión multivariada para los niveles de anticuerpos IgG para los antígenos de *P. vivax*.

Tabla N°07. Análisis de regresión multivariada para los niveles de anticuerpos IgG para los antígenos de *P. falciparum*.

Tabla N°08. Cuantificación relativa de anticuerpos IgG específicos contra las proteínas recombinantes

ABREVIATURAS

GR: Glóbulos rojos

MSP: Proteínas de Superficie del Merozoito

GPI: Glicosil Fosfatidil Inositol

AMA: Proteína Apical de Membrana

GLURP: Proteína Rica en Glutamato

Rh: Reticulocito

qPCR: Reacción en cadena de la polimeraza cuantitativa en tiempo real

LB: Luria Bertani

S.O.C: Medio súper óptimo con represión de catabolitos

Sf9: *Spodoptera frugiperda* 9

SFB: Suero fetal bovino

MOI: Multiplicidad de infección

TOI: Tiempo de infección

MilliQ: Agua ultra pura

DO: Densidad Óptica

TMB: Tetrametilbenzidina

PBS: Buffer fosfato salino

EDC: N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida)

S-NHS: N-hidroxisulfosuccinimida

MFI: Intensidad de Fluorescencia Media

RESUMEN

La evaluación de marcadores de seroprevalencia de malaria es un paso trascendental para llevar a cabo un monitoreo real de la transmisión de la enfermedad. Por esta razón, este estudio se centró en la producción (expresión Baculovirus y células de insecto) y evaluación de las proteínas recombinantes rPvMSP8 y rPfRH2B de *Plasmodium vivax* y *P. falciparum* respectivamente, como nuevos seromarcadores de malaria en la Amazonia peruana. Así mismo, se evaluó en conjunto con las proteínas rPvMSP10 y rPfMSP10 (evaluados por nuestro grupo) en conjunto con seromarcadores de referencia (rPvMSP1, rPvAMA1, rPfMSP1 y rPfGLURP).

Para esto, 421 muestras de suero provenientes de un barrido poblacional de las comunidades de Cahuide (n=257) y Lupuna (n=164), en el departamento de Loreto, fueron utilizados para evaluar los niveles de IgG específicos contra las 8 proteínas recombinantes mediante la plataforma de ensayo Luminex® multiplex.

Un análisis de regresión multivariada indicó que los títulos de IgG para las 4 proteínas estuvieron asociados a la edad de los pacientes, mostrando una posible respuesta acumulativa, generando memoria humoral, tanto en pacientes expuestos y no expuestos. Además, los títulos de IgG para PvMSP10 y PvMSP8 se asociaron significativamente con la historia de infecciones pasadas por *P. vivax* solo en la comunidad con baja transmisión (Cahuide). Estos resultados demuestran que para mantener y detectar niveles circulantes de IgG específicos contra estas proteínas se necesitaría exposición recurrente a *Plasmodium* spp., y así serían de utilidad como posibles marcadores serológicos útiles para la identificación de “hotspots” de

transmisión remanentes. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales para confirmar a estas proteínas como seromarcadores.

Palabras clave: Malaria, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, Baculovirus, seromarcadores, Amazonía Peruana, PvMSP8, PvMSP10, PfMSP10 y PFRH2B.

ABSTRACT

Malaria seroprevalence evaluation is a transcendental step to carry out real monitoring of disease transmission. For this reason, this study have focused on the production (Baculovirus expression and insect cells) and evaluation of the recombinant rPvMSP8 and rPfrRH2B proteins of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* respectively, as new malaria sero-marker in the Peruvian Amazon. These proteins were evaluated together with rPvMSP10 and rPfMSP10 proteins (previously evaluated by our group) in conjunction with reference seromarkers (rPvMSP1, rPvAMA1, rPfMSP1 and rPfGLURP).

For this, 421 serum samples from a cross sectional study population of two Loreto communities, Cahuide (n = 257) and Lupuna (n = 164), were used to assess specific IgG levels against the 8 recombinant proteins using a Luminex® multiplex assay. A multivariate regression analysis indicated that the IgG titers for the 4 novels proteins were associated with the patients' age, showing a possible cumulative response, generating humoral memory, both in exposed and unexposed patients. In addition, IgG titers for PvMSP10 and PvMSP8 were significantly associated with the history of *P. vivax* passed infections only in the low transmission community (Cahuide). These results suggest that in order to maintain and detect specific circulating levels of IgG against these proteins, recurrent exposure to *Plasmodium spp.* is necessary, and thus would be suitable as possible serological markers useful for the identification of remaining transmission hotspots. However, additional studies are necessary to confirm these proteins as seromarkers.

Keywords: Malaria, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, Baculovirus, seromarkers, Peruvian Amazon, PvMSP8, PvMSP10, PfMSP10 and PfRH2B.

1. INTRODUCCIÓN

La malaria sigue siendo una de las enfermedades infecciosas más importantes en términos de morbilidad y mortalidad a nivel mundial afectando a 106 países. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2017 se reportaron 219 millones de casos y 435,000 muertes a nivel mundial, siendo la mayoría de estos en la Región de África.

En humanos, la malaria es causada por 5 especies de parásitos pertenecientes al género *Plasmodium*, estas son: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*. Los parásitos son transmitidos mediante la picadura de mosquitos del género *Anopheles* y existen 30 especies de este género considerados vectores importantes. En el caso de *P. knowlesi*, se sabe que esta especie infecta a monos en ciertas áreas forestales del Sur-este de Asia, pero recientemente se han reportados casos de infección en humanos (OMS, 2018). En el Perú las dos especies causantes de la malaria son *P. vivax* (79.9%) y *P. falciparum* (20%), y el vector más importante en la región Amazónica es el mosquito *A. darlingi* (Minsa, 2018).

Dado que esta enfermedad sigue siendo un problema de salud pública en el Perú, en la actualidad el Ministerio de Salud está implementando programas de control con miras a la eliminación de la malaria en el país, como es el programa “Plan Malaria Cero Periodo 2017-2021”. Así, en un contexto de control y pre-eliminación, en donde la transmisión se ve disminuida, se hace crítica la vigilancia para poder identificar poblaciones en donde se hallen remanentes de casos de

infección y exposición. De esta manera, la vigilancia posibilitaría enfocar esfuerzos en zonas o poblaciones en riesgo de manera más eficiente para ser controladas rápidamente (Greenhouse *et al.*, 2019).

Entre las estrategias de vigilancia, la sero-vigilancia es una herramienta que ha probado ser de gran utilidad para la identificación de poblaciones en riesgo. Se basa en el uso de anticuerpos especie-específicos como biomarcadores para monitorear la exposición, transmisión e inmunidad. Además, gracias a que los anticuerpos persisten por un periodo de tiempo, esta herramienta es útil en áreas con transmisión altamente estacional (Corran *et al.*, 2007; Drakeley *et al.*, 2009).

Un punto crítico en la implementación de seromarcadores para una región es la elección de antígenos. El primer paso a seguir para la definición de estos marcadores es la determinación de su antigenicidad, es decir, que sean capaces de reconocer individuos expuestos y diferenciarlos de no expuestos. Esta determinación implica el estudio de la magnitud de respuesta de anticuerpos que se genera en el paciente, la duración de estos anticuerpos en suero, la sensibilidad y especificidad de esta respuesta (Elliott *et al.*, 2014). Dado que estas características son dependientes tanto de la genética de los individuos, de su respuesta inmunológica y de los parásitos presentes en la región; la elección de antígenos como seromarcadores debe hacerse de manera específica dentro del contexto en que serán utilizados (Elliott *et al.*, 2014). Por esta razón, este estudio busca evaluar seromarcadores que sean capaces de identificar poblaciones expuestas a malaria en diferentes contextos de transmisión dentro de la Amazonía peruana. Para ello, se propone probar 8 proteínas del estadio asexual de *Plasmodium spp.*, PvMSP1,

PvAMA1, PvMSP8, PvMSP10 de *P. vivax* y PfMSP1, PfGLURP, PfMSP10 y PfRH2B de *P. falciparum*, proteínas que han sido identificados como seroreactivos en estudios previos con muestras provenientes de esta región.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Malaria en el Perú

A pesar de los esfuerzos realizados en nuestro país en 2005 al 2009 por el Proyecto “Control de la Malaria en las Zonas Fronterizas de la Región Andina: Un Enfoque Comunitario” (PAMAFRO), donde se reportó 23,060 casos en total a nivel nacional (11,779 en el Departamento de Loreto), la cantidad de casos se ha visto incrementada, considerándose a la malaria, como una enfermedad re-emergente (MINSA, 2018). Según datos de Ministerio de Salud la cantidad total de casos en 2018 fue de 44,406 siendo el Departamento de Loreto el más afectado con 42,868 casos (96.5 % de los casos). Esta enfermedad infecciosa también afecta a la región de la selva central en los valles de los ríos Apurímac, Ene y Mantaro (VRAEM), el cual está comprendido por los departamentos de Junín, Huancavelica, Cusco, Ayacucho y Apurímac. Con una menor incidencia se ven afectados los departamentos de Ayacucho, Cusco, Ucayali, La Libertad y con algunos casos esporádicos y/o importados los departamentos de Madre de Dios, Piura, Cajamarca, Cerro de Pasco, Huánuco e Ica (MINSA, 2018).

La poca sensibilidad de los métodos de diagnóstico y la falta de instrumentos costo-efectivos para estimar la prevalencia real de esta enfermedad han sido, en gran manera, los motivos de este problema de salud pública (Torres *et al.*, 2014). Por esta razón, el desarrollo de herramientas que contribuyan a la implementación de estrategias de control efectivas para el monitoreo, prevención y erradicación de esta enfermedad es crítica (Elliott *et al.*, 2014; WHO, 2018).

2.2. Ciclo de vida de *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*

El ciclo de vida, tanto de *P. falciparum* como de *P. vivax*, pasa por una fase sexual la cual ocurre dentro del mosquito vector y una fase asexual dentro del hospedero vertebrado (los humanos) (Ghosh *et al.*, 2000; Mueller *et al.*, 2009). En los humanos, luego de la picadura por un mosquito infectado, los esporozoitos migran a través del torrente sanguíneo hacia los hepatocitos. El crecimiento y desarrollo que se produce durante esta etapa hepática es diferente entre las dos especies; mientras que los parásitos *P. falciparum* se dividen mitóticamente en miles de merozoitos que se liberarán en el torrente sanguíneo, en *P. vivax* puede desarrollarse directamente en merozoitos o diferenciarse en una etapa latente (hipnozoíto), que puede reactivarse meses o años después de la primera picadura del mosquito, y solo entonces formar merozoitos (Mueller *et al.*, 2009).

La invasión del merozoito a los glóbulos rojos es un proceso de múltiples pasos mediados por una serie de interacciones específicas entre los receptores de los eritrocitos y los ligandos en el parásito (Tham, 2012). Mientras que *P. falciparum* puede invadir tanto los eritrocitos maduros (normocitos) como los eritrocitos jóvenes (reticulocitos), *P. vivax* solo invade los reticulocitos o incluso las células inmaduras más jóvenes (eritroblastos). Como resultado, *P. vivax* utiliza diferentes interacciones ligando-receptor que se dirigen específicamente a estas células jóvenes (Mueller *et al.*, 2009; Tham *et al.*, 2012). Como los reticulocitos suelen ser menos del 2% de la población total de eritrocitos, las infecciones por *P. vivax* suelen ser de baja densidad de parásitos. Una vez en el

torrente sanguíneo los merozoitos inician la invasión de otros glóbulos rojos donde proliferarán, causando la ruptura y liberación de los parásitos y demás componentes celulares. Este proceso es el causante de la sintomatología asociada a la malaria debido a la respuesta inmune generada (White *et al.*, 2014).

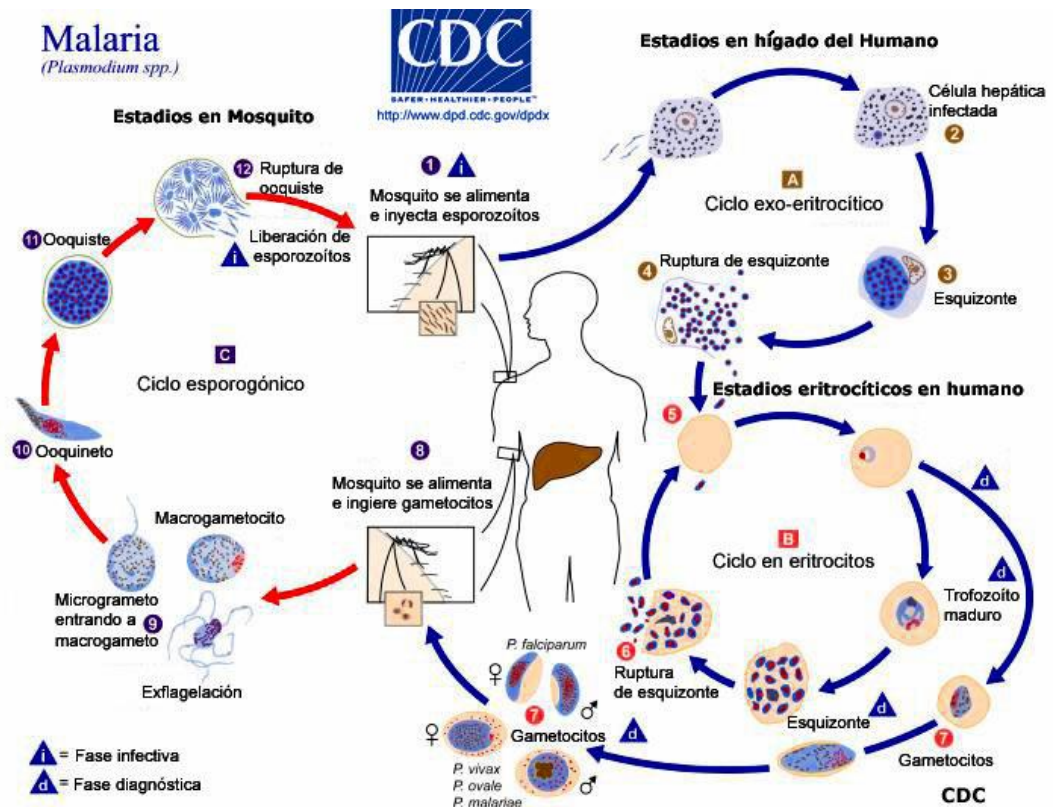


Figura N°01. Ciclo de vida de *Plasmodium spp.* Una vez que el mosquito infectado inyecta los esporozoitos al picar al hospedero humano, estos viajan por el torrente sanguíneo hacia el hígado donde infectan las células hepáticas formando esquizontes. Estos esquizontes pasan por un proceso de ruptura y los parásitos son liberados nuevamente al torrente sanguíneo donde invaden glóbulos rojos. Al dividirse, los merozoitos causan la ruptura de los eritrocitos y son nuevamente liberados para seguir el proceso de invasión a más eritrocitos. Imagen. (Imagen tomada de www.dpd.cdc.gov).

Una fracción de los merozoitos se convertirá en gametocitos, los cuales serán ingeridos por el mosquito al picar a un individuo infectado, comenzando el ciclo sexual. El desarrollo de *P. falciparum* a gametocitos tarda entre 10 y 12 días, y ocurre en gran parte dentro de la médula ósea. En cambio, los gametocitos de

P. vivax se desarrollan rápidamente y aparecen en el torrente sanguíneo tres días después de que se observan los primeros parásitos asexuales; es decir, incluso antes del desarrollo de los primeros síntomas de malaria, lo que hace que *P. vivax* sea altamente transmisible (Mueller *et al.*, 2009).

2.3. Transmisión de la malaria e infecciones asintomáticas en la Amazonía peruana.

La transmisión de la malaria en la Amazonía peruana no es homogénea dentro de las zonas endémicas, sino más bien se da por agrupamientos de individuos infectados dentro de pequeños subgrupos de la población (Vinetz *et al.*, 2002; Branch *et al.*, 2005). Este fenómeno podría explicar el porqué de la baja incidencia de malaria, ya que de esta manera la frecuencia de infección real en algunas personas sería mayor que la estimada para toda la población (Branch *et al.*, 2005).

La dinámica de transmisión de malaria depende principalmente de la locación de criaderos de mosquitos, que ha venido siendo alterada por la deforestación (Abeles *et al.*, 2011), y agrupamiento de viviendas cerca de estos criaderos donde las personas sirven como reservorio de parásitos que reinfectarán a los mosquitos (Vinetz *et al.*, 2002). Por esta razón, es también importante entender la ecología, comportamiento y estructura poblacional del vector para la elaboración de estrategias para el control de la transmisión (Abeles *et al.*, 2011).

Adicionalmente, los factores sociodemográficos también influyen de gran

manera la dinámica de transmisión. En la región Amazónica peruana la mayoría de personas encuentran su sustento económico en la agricultura, pesca y extracción de madera (Carrasco *et al.*, 2015). Estas actividades ocurren a menudo en lugares lejanos a sus viviendas por lo que muchos de los pobladores viajan durante la semana a diferentes zonas endémicas, lo que hace posible la importación de casos dentro de las comunidades.

Otro factor importante en zonas donde la malaria es endémica es la presencia de pacientes que a pesar de estar infectados con *Plasmodium sp.* no manifiestan la sintomatología asociada, a estos pacientes se les denomina asintomáticos (Bousema *et al.*, 2014; Clark *et al.*, 2012). En la región Amazónica de Loreto, se estima que 30-60% de individuos infectados son asintomáticos (Vinetz *et al.*, 2002; Clark *et al.*, 2012). Al contrario de lo que ocurre en zonas donde la transmisión de la malaria es intensa, como en África, donde la inmunidad clínica se adquiere solo luego de varios años de re-infecciones y se ve asociación con la edad y nivel de exposición (Rouhani *et al.*, 2015), en zonas hipoendémicas como son Indonesia, la Amazonía peruana y brasileña, se ha visto que esta inmunidad puede ser alcanzada rápidamente (hasta en dos años), requiriendo menos procesos de re-infección (Villasis *et al.*, 2012) y no se ha visto asociación con la edad (Rouhani *et al.*, 2015). La respuesta inmune que confiere protección clínica contra la infección por *Plasmodium spp.* sería área-específica y no ofrecería protección en individuos hacia diferentes cepas de parásitos de otras zonas (Alves *et al.*, 2002).

La presencia de asintomáticos cobra importancia pues, al no presentar síntomas, estos individuos no acuden a los centros de salud y no reciben el tratamiento adecuado representando reservorios que mantienen la transmisión y que potencialmente pueden introducir o reintroducir parásitos a zonas donde la eliminación habría sido alcanzada (Abeles *et al.*, 2011, Villasis *et al.*, 2012). Por esta razón, el incluir estrategias eficientes para identificar pacientes asintomáticos, además de incluir comunidades en donde su presencia es común, es esencial para entender mejor la ecología de la transmisión de malaria y los mecanismos que permiten desarrollar este tipo de inmunidad (Vinetz *et al.*, 2002, Alves *et al.*, 2002).

2.4. Estudios de Seroprevalencia como herramienta para el control de transmisión de la malaria

Los marcadores de seroprevalencia se basan en la identificación, en suero de pacientes, de los niveles de anticuerpos específicos generados como respuesta inmunológica a determinados antígenos del parásito (Crompton *et al.*, 2010). Asimismo, ya que los anticuerpos persisten en sangre son menos afectados por la estacionalidad o transmisión inestable de la enfermedad (WHO, 2018; Crompton *et al.*, 2010), siendo útiles como marcadores.

Los estudios de seroprevalencia, mediante la utilización de marcadores seroepidemiológicos, han probado ser de gran utilidad; permitiendo la detección de focos de transmisión de la malaria, así como la identificación de factores de riesgo asociados a esta enfermedad (Elliott *et al.*, 2014; Folegatti *et al.*, 2017).

Además, este tipo de estudios pueden ser usados para evaluar los cambios en la transmisión de la malaria entre temporadas (Dewasurendra *et al.*, 2017) y después de intervenciones efectuadas por el Ministerio de Salud (Folegatti *et al.*, 2017; Crompton *et al.*, 2010). Por lo tanto, la producción y evaluación de marcadores confiables para medir la seroprevalencia de malaria es un paso trascendental para llevar a cabo un monitoreo real de la transmisión de esta enfermedad (Crompton *et al.*, 2010; Dewasurendra *et al.*, 2017).

Uno de los problemas con respecto a los marcadores seroepidemiológicos clásicos para malaria, es que han sido elegidos basándose en estudios realizados en zonas hiperendémicas de África (Noland *et al.*, 2014; Salavatfarm *et al.*, 2015; Corran, 2007). Sin embargo, el contexto natural de malaria es dependiente de la región geográfica donde se desarrolla (Folegatti *et al.*, 2017; Stewart *et al.*, 2009) y, por tanto, no todos los marcadores serológicos usados en zonas hiperendémicas serían de utilidad en una región como la Amazonía peruana donde la transmisión de la malaria es continua y con epidemias de estacionalidad marcada. Más aún, estudios previos en la zona periurbana a Iquitos han encontrado una incidencia muy alta de malaria en comunidades individuales o incluso en grupos de familias dentro de estas, lo que sugiere una heterogeneidad altamente espacial en la transmisión de la malaria a pequeña escala (Chuquiyauri *et al.*, 2015). Por esta razón, es de suma importancia contar con este tipo de marcadores específicos para nuestra Amazonía. También se debe tener en cuenta que, dada la alta variabilidad en la respuesta inmune entre diferentes individuos, para aumentar la precisión del estudio de la transmisión,

sobre todo en ambientes de hipoendémicos, es recomendable utilizar la respuesta conjunta a más de un antígeno (Orlani *et al.*, 2006; Fowkes *et al.*, 2010; Takem *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2003).

Otra de las dificultades que afrontan actualmente este tipo de estudios es que no existe un consenso sobre la elección del marcador ideal para estimar la seroprevalencia en una región (Folegatti *et al.*, 2017); no obstante, existen pautas a tener en cuenta. Dentro de estas pautas se considera que el marcador debe ser inmunogénico, no debe ser muy polimórfico y que su síntesis debe ser bastante parecida a las encontradas en condiciones naturales (Sturrock *et al.*, 2013; Elliott *et al.*, 2014). Además, dado que la malaria es única por región endémica, la elección de un marcador de seroprevalencia para una región debe realizarse en base a datos preliminares de la evaluación del mismo en el área de su implementación (Corran *et al.*, 2007; Sturrock *et al.*, 2013).

2.5. Proteínas del estadio asexual del merozoito

Las proteínas del estadio asexual del merozoito están involucradas en el proceso de invasión del parásito a los glóbulos rojos (GR). Durante este proceso quedan expuestas al sistema inmune del hospedero, ya que el merozoito es liberado al torrente sanguíneo para seguir con la invasión de otros GR, haciendo posible que se genere interacción y una respuesta inmune frente a ellas (Boyle *et al.*, 2014; Garzón *et al.*, 2011). Por todo esto, muchas de estas proteínas han sido extensamente consideradas como potenciales candidatos para el desarrollo de vacunas y algunas han logrado alcanzar la fase 1 y 2 de ensayos clínicos (Garzón

et al., 2011).

2.5.1. MSP1, AMA1 y GLURP

Las Proteínas de Superficie del Merozoito (MSP) han mostrado ser blancos importantes de la inmunidad adaptativa, particularmente de anticuerpos por lo que, además de un rol potencial como vacunas, podrían ser utilizadas como herramientas para el desarrollo de pruebas de diagnóstico y estudios de seroprevalencia en comunidades endémicas (Garzón *et al.*, 2011). MSP1, fue la primera proteína descrita de esta familia y ha sido una de las más estudiadas. MSP1 es una proteína de aproximadamente 1700 aminoácidos (aa) que atraviesa por un proceso proteolítico generando 4 fracciones: 83kDa, 30kDa, 38kDa y 42kDa. El último fragmento se ancla a la membrana mediante Glicosil Fosfatidil Inositol (GPI) y posee dos regiones llamado Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) (Chitarra *et al.*, 1999). Además, se sabe que es una proteína crítica para el proceso de invasión al GR encontrándose que anticuerpos contra esta pueden inhibir dicho proceso (Woehlbier *et al.*, 2006; Li, 2014). Estudios realizados en la Amazonía peruana determinaron que los anticuerpos producidos hacia esta proteína, en pacientes infectados con *P. falciparum*, se mantenían hasta por 4 meses (Torres *et al.*, 2008). Más aún, el uso de este antígeno, junto con la Proteína Apical de Membrana (AMA1) y la Proteína Rica en Glutamato (GLURP), en estudios longitudinales han mostrado ser eficaces para caracterizar la transmisión estacional de malaria en zonas de baja transmisión (Cook *et al.*, 2010) y para la determinación de *Hotspots* en la Amazonía peruana (Rosas *et al.*, 2015).

La proteína AMA1 está conformada por aproximadamente 600 aa. Al igual que MSP1 y GLURP, este antígeno cumple un rol importante durante el proceso de invasión al GR. Por esta razón, estas proteínas han sido consideradas en diversos estudios como potenciales candidatos a vacuna (Stowers *et al.*, 2002; Dutta *et al.*, 2007). Sin embargo, ninguna de estos tres antígenos ha logrado mostrar eficacia como vacuna por diversas razones, siendo una de estas el alto grado de polimorfismos presentes. Por este motivo, se recomienda el uso de estas proteínas en conjunto al ser utilizadas como marcadores serológicos.

2.5.2. MSP8

La proteína MSP8 es una de las proteínas ancladas por GPI presente en el estadio sanguíneo de *Plasmodium*. Contiene una secuencia señal en el extremo N-terminal y dos dominios EGF en el extremo C-terminal. Existen pocos estudios que hayan utilizado esta proteína como blanco de investigación. Tres estudios determinaron que PvMSP8 es altamente antigénica (Chen *et al.*, 2010; Chuquiyauri *et al.*, 2015 y Cheng *et al.*, 2017). Esta proteína presentó una alta especificidad para pacientes con *P. vivax* y se encontró que los anticuerpos producidos contra esta proteína persistían por hasta más de un mes (Cheng *et al.*, 2017). Por estas evidencias, consideramos que PvMSP8 podría ser utilizada como una herramienta para el monitoreo de transmisión de la malaria específica a *P. vivax*.

Como parte de la investigación preliminar para la búsqueda de marcadores,

nuestro grupo realizó un estudio de la respuesta inmune contra un panel de casi 3,000 proteínas de *P. vivax* y *P. falciparum* con suero de pacientes de la Amazonía peruana, encontrándose alta reactividad contra PvMSP10, PvMSP8, PfMSP10 y PfrRH2B en pacientes sintomáticos y asintomáticos infectados con *P. vivax* y *P. falciparum* respectivamente (Chuquiyauri *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2014).

2.5.3. MSP10

La proteína MSP10, identificada por primera vez por Black *et al.* en *P. falciparum*, es una proteína de 524 aa, mientras que MSP10 de *P. vivax* (PvMSP10) es una proteína más pequeña, de 379-489 aa (Pacheco *et al.*, 2012). Esta proteína se caracteriza por tener 2 dominios EGF en tándem en su extremo C terminal (Black *et al.*, 2003, Perez-Leal *et al.*, 2005), estos dominios parecen estar involucrados en las interacciones entre los merozoitos y gametocitos con sus respectivas células blanco y han sido identificados en 7 proteínas de *P. falciparum* (Perez-Leal *et al.*, 2005). También posee dos regiones hidrofóbicas en los extremos N y C-terminal, un péptido señal y un sitio de anclaje GPI, respectivamente. La proteína se expresa durante la fase asexual de los parásitos y se localiza en su superficie (Perez-Leal *et al.*, 2005).

Tanto PfMSP10 como PvMSP10 pueden inducir respuesta celular y humoral en pacientes con malaria y la respuesta serológica se caracteriza por altos títulos de IgG anti MSP10 (Cheng *et al.*, 2014, Chuquiyauri *et al.*, 2015, Giraldo *et al.*, 2009). Se sabe también que los anticuerpos anti PfMSP10 carecen de

reactividad cruzada con otras proteínas MSP (Chuquiyaury *et al.*, 2015).

Más aún, estudios realizados por nuestro grupo identificaron la proteína MSP10, como altamente reactiva en pacientes sintomáticos y asintomáticos con infección por *P. vivax* y *P. falciparum* (Chuquiyaury *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2014). Con estos resultados se podría sugerir que esta proteína podría funcionar en estudios serológicos para identificar exposición a malaria en poblaciones.

2.5.4. RH2B

Las proteínas homólogas de unión al reticulocito (Rh) también participan en la unión del parásito *Plasmodium spp.* al GR. Entre estas, las proteínas PfrRH2A y PfrRH2B, pasan por un complejo proceso de clivaje durante la invasión de merozoitos. Además, se ha encontrado que anticuerpos dirigidos a estas proteínas bloquean la invasión del merozoitos al GR, demostrando su importante función (Triglia *et al.*, 2011). En un estudio previo se encontró que tanto las proteínas PfrRH2A como PfrRH2B fueron reconocidas por anticuerpos de pacientes sintomáticos como asintomáticos (Villasis *et al.*, 2012) Esto mismo fue reportado en un estudio utilizando *proteinarrays* contra un panel de más de 2000 proteínas de *Plasmodium spp* (Torres, *et al.*, 2015).

2.6. Sistema de expresión de Baculovirus en células de Eucariotas

A pesar de la rapidez y facilidad de los sistemas de expresión en bacterias, existen obstáculos para la expresión eficiente de las proteínas de *Plasmodium* en este sistema como son su peso molecular generalmente alto (> 56 kDa), pH

básico (> 6), falta de homología con las proteínas bacterianas, insertos específicos de *Plasmodium*, regiones transmembrana, péptidos señal, puentes disulfuro y motivos de exportación (Victor *et al.*, 2006).

Como alternativa, el sistema de Baculovirus que utiliza células eucariotas de insecto para expresar proteínas recombinantes, tiene la ventaja de permitir la producción de proteínas recombinantes de alto peso molecular, reconocer señales de orientación eucarióticas y poseer maquinaria post-traduccional propia de estas células (Birkholtz *et al.*, 2008; Victor *et al.*, 2006). Por lo tanto, el plegado y ensamblaje de las proteínas sintetizadas puede ser similar al procesamiento natural en *Plasmodium*. De esta manera, al plegarse correctamente, producirá proteínas inmunológicamente activas capaces de ser reconocidas por anticuerpos monoclonales conformación-específicos (Birkholtz *et al.*, 2008). Esta característica es vital si se quiere evaluar la respuesta inmunogénica del hospedero a una proteína recombinante de *Plasmodium*, como es el caso de potenciales marcadores serológicos. Más aún, se ha demostrado que las células de insecto expresan proteínas de *Plasmodium* que conservan epítopes conformacionales y provocan respuestas de anticuerpos IgG específicos (Leung *et al.*, 2004; Barford *et al.*, 2007). Diversos estudios demuestran que el sistema de expresión con Baculovirus es capaz de expresar correctamente proteínas de *P. falciparum* que, bajo el sistema de *E. coli*, fue imposible por la aparición de cuerpos de inclusión (Mehlin *et al.*, 2006; Kost *et al.*, 2005)

Sin embargo, este sistema requiere una inversión considerable en tiempo y recursos financieros y técnicamente es más exigente que manipular *E. coli*. A pesar de esto, el sistema de Baculovirus es una herramienta valiosa para la expresión de proteínas de *Plasmodium* y representa una alternativa viable para explorar, especialmente porque es difícil predecir qué hospedero heterólogo será óptimo para la expresión de una proteína específica.

3. JUSTIFICACIÓN

Como ya se mencionó anteriormente, la eficacia de un candidato a marcador serológico estará condicionada al contexto en el que será utilizado (Elliott *et al.*, 2014). De esta manera, a pesar de que las proteínas PvMSP1, PfMSP1, PvMSP8, PvMSP10, PfMSP10, PfRH2B, PvAMA1 y PfGLURP han sido ya reportadas como sero-reativas, estos resultados dependen del escenario en el que fueron analizadas. Dentro de los factores que definen este contexto están: la endemicidad de la malaria en la región geográfica, los factores genéticos asociados a los parásitos y a los individuos de la región, la variabilidad de la respuesta inmune entre individuos, el sistema elegido para la síntesis de las proteínas recombinantes y el tipo de técnica utilizada en el estudio (Elliott *et al.*, 2014, Greenhouse *et al.*, 2019). Por esta razón, en esta tesis se analizaron por primera vez como marcadores de seroprevalencia en la Amazonía peruana a las proteínas PvMSP8 y PfRH2B, junto con PvMSP10 y PfMSP10 previamente evaluadas por nuestro grupo (Carrasco *et al.*, 2017). Además, este análisis se realizó en un sistema multiplex con tecnología Luminex®, el cual permitió el estudio en conjunto con las proteínas PvMSP1, PfMSP1, PvAMA1 y PfGLURP, las cuales ya han sido utilizadas como seromarcadores referenciales en esta región (Rosas-Aguirre *et al.*, 2015)

En primera instancia, la evaluación de las proteínas se realizó mediante la técnica de ELISA con sueros controles positivos y negativos de pacientes de la región Amazónica para determinar si efectivamente estas proteínas son sero-reativas. Una vez comprobada la antigenicidad de las proteínas recombinantes,

estas fueron evaluadas como posibles marcadores de seroprevalencia. Para este objetivo, se utilizó muestras de sueros obtenidos mediante barrido poblacional de dos comunidades del departamento Loreto, con diferentes niveles de transmisión de malaria, mediante un ensayo de Luminex® Multiplex. Con esto se espera determinar si existe una respuesta de anticuerpos IgG diferencial específica contra las proteínas obtenidas por diferentes sistemas de expresión, para establecer los mejores marcadores serológicos para nuestra región.

4. HIPOTESIS

La respuesta específica de anticuerpos IgG contra las proteínas recombinantes rPvMSP8, rPvMSP10, rPfMSP10 y rPfrRH2B es mayor en pacientes expuestos a la infección por *P. falciparum* y *P. vivax*, en comparación con los no expuestos a la infección, en poblaciones de la Amazonía peruana con diferentes niveles de transmisión de malaria siendo de utilidad como parte un panel de seromarcadores epidemiológicos.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar la seroreactividad de las proteínas recombinantes rPvMSP8, y rPFRH2B en conjunto con los marcadores serológicos rPvMSP10, rPfMSP10 y de referencia rPvMSP1, rPfMSP1, rPvAMA1 y rPfGLURP como potenciales nuevos seromarcadores de malaria para la Amazonia peruana.

5.2. Objetivos específicos

- Expresar y purificar las proteínas rPvMSP8 y rPFRH2B mediante un sistema de Baculovirus en células de insecto.
- Evaluar la seroreactividad de las proteínas rPvMSP1, rPfMSP1, rPvMSP8, rPvMSP10, rPfMSP10, rPFRH2B, rPvAMA1 y rPfGLURP mediante ensayos de ELISA en muestras de pacientes controles positivos y negativos.
- Estandarizar el ensayo de Luminex® Multiplex y evaluar los niveles de anticuerpos IgG específicos contra las proteínas rPvMSP1, rPfMSP1, rPvMSP8, rPvMSP10, rPfMSP10, rPFRH2B, rPvAMA1 y rPfGLURP en sueros de pacientes provenientes de barridos poblacionales en las comunidades de Cahuíde y Lupuna,.
- Determinar la relación de los niveles de anticuerpos IgG específicos contra las proteínas rPvMSP1, rPfMSP1, rPvMSP8, rPvMSP10, rPfMSP10, rPFRH2B, rPvAMA1 y rPfGLURP con exposición a malaria, edad/ sexo de los pacientes, historial de episodios de malaria previa y a su contexto de transmisión como seromarcadores en la Amazonía peruana.

6. METODOLOGÍA

6.1. Diseño del estudio

La primera etapa de este estudio, la cual comprendió la producción de proteínas en un sistema de Baculovirus, tuvo un diseño de tipo descriptivo experimental. La segunda etapa, en la cual se evaluó la respuesta serológica de las proteínas producidas en conjunto con antígenos previamente estudiados en un ensayo multiplex, tuvo un diseño de tipo transversal con muestras obtenidas mediante un barrido poblacional.

Los pacientes fueron enrolados en Agosto y Setiembre del 2012 y se realizó una toma de muestra de sangre en papel filtro luego de firmar el consentimiento informado para realizar el diagnóstico de malaria por PCR. En modo de seguimiento, se les realizó una segunda toma de sangre en papel filtro en diciembre del 2012. Las muestras de sueros, para la evaluación de anticuerpos IgG específicos, fueron recolectadas en Enero de 2013 en un barrido poblacional llevado a cabo por el proyecto “Amazonian International Center of Excellence for Malaria Research” (ICEMR-Amazonía). Se colectó previa firma de consentimiento o asentimiento informado, mediante venopunción, 6mL de sangre para adultos y 3mL para los niños, en tubos EDTA. Una vez obtenidas, las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm para separar el suero y paquete globular. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su procesamiento.

Como criterios de inclusión, se consideraron a todos los pacientes que hayan

firmado consentimiento o asentimiento informado y que cuenten con diagnóstico por PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR). El qPCR utilizado tuvo como blanco el gen ribosomal, subunidad menor 18S (rRNA.18S) (Mangold *et al.*, 2005) Bajo estos criterios, se consideraron un total de 421 muestras de suero (257 de Cahuide y 164 de Lupuna).

En este estudio, se consideró como individuos expuestos a *Plasmodium spp.* a todos aquellos que hayan tenido resultados positivos de diagnóstico por qPCR en cualquiera de las tomas de muestra de sangre (agosto o setiembre del 2012, diciembre 2012 y enero 2013)

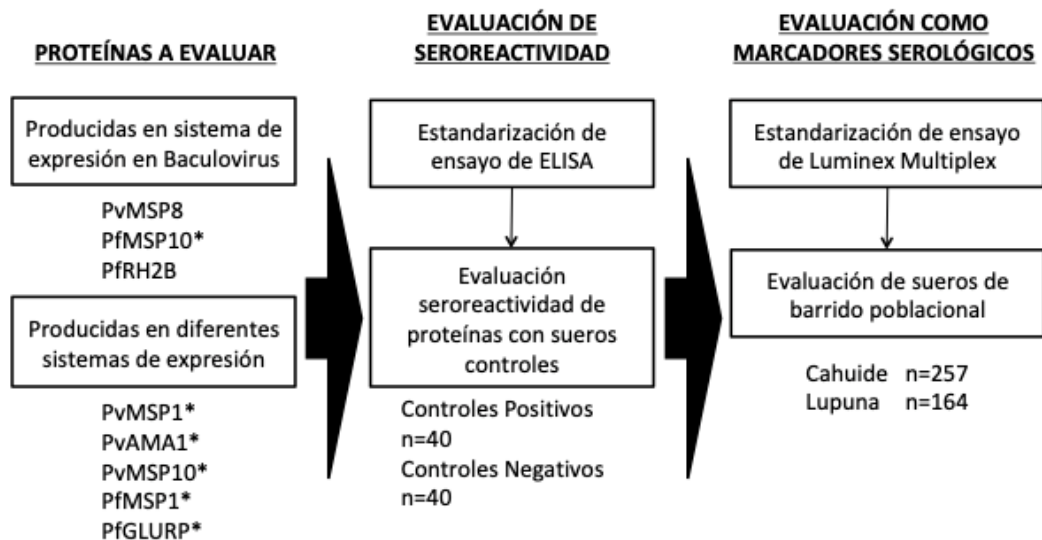


Figura N°02. Flujograma de diseño de estudio. *Proteínas sintetizadas comercialmente.

6.2. Población de estudio y muestra

Se trabajó con dos grupos muestrales; un primer grupo de muestras para determinar si las proteínas expresadas en un sistema de Baculovirus, PvMSP8

y PfrRH2B, efectivamente generaban una reacción con anticuerpos IgG diferencial entre pacientes sanos y pacientes infectados con *Plasmodium spp.* mediante ensayos de ELISA, y un segundo grupo de muestras para probar el conjunto de proteínas, PvMSP1, PvAMA1, PvMSP8, PvMSP10, PfMSP1, PfGLURP, PfMSP10 y PfrRH2B, como potenciales marcadores serológicos para la Amazonía peruana en un ensayo multiplex.

De esta manera, para la determinación de niveles de anticuerpos IgG específicos contra las proteínas recombinantes PvMSP8 y PfrRH2B, se utilizaron sueros controles positivos de pacientes de Loreto, Perú, con infección aguda por *P. vivax* (n=40) y *P. falciparum* (n=40), respectivamente, determinadas por qPCR. Estas muestras fueron recolectadas en un estudio previo (SIDISI: 57459). Además, se utilizaron 40 muestras de individuos sanos, conformados por 20 muestras de una zona endémica de malaria (Loreto, Perú) y 20 muestras de individuos sin historial de haber viajado a zona endémica de malaria.

Para el estudio de potenciales seromarcadores, se trabajó con muestras de suero provenientes de dos comunidades de Loreto; Cahuíde y Lupuna (Fig. N°03). La comunidad de Cahuíde, se encuentra en el distrito de San Juan Bautista a 60 Km al sur de la ciudad de Iquitos, en la intersección de la carretera Iquitos-Nauta y el río Itaya y está conformada por las localidades de 12 de Abril, Cahuíde y La Habana, donde su principal actividad económica es la producción de palma aceitera. La transmisión de malaria en esta comunidad tiene un patrón heterogéneo y ha presentado una disminución desde el año 2011 (Carrasco *et*

al., 2017).

La segunda, Lupuna, es una comunidad rivereña del río Nanay, para la cual la única vía de acceso es por transporte fluvial a 10 Km de la ciudad de Iquitos. Está compuesta por tres centros poblados; San José de Lupuna, San Pedro y Santa Rita y sus principales actividades incluyen el cultivo de yuca y la producción de carbón vegetal. La transmisión de malaria en esta comunidad es constante con picos durante la temporada de lluvias, entre los meses de noviembre a mayo.

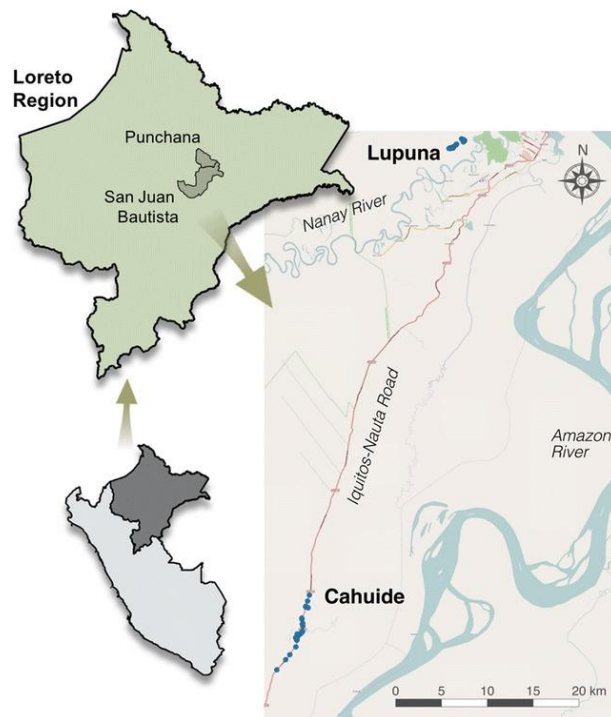


Figura N°03. Área de estudio. Las muestras del barrido poblacional fueron colectadas en las comunidades de Cahuide y Lupuna. Los puntos azules indican las viviendas censadas. (Carrasco, 2015).

Ambas comunidades están conformadas por una población mayoritariamente mestiza y las principales estrategias locales de subsistencia incluyen la

agricultura, tala y quema de arboles, pesca, caza y la producción de carbón a pequeña escala.

6.3. Proteínas recombinantes

Ocho proteínas fueron evaluadas en este estudio como marcadores de seroprevalencia. Las proteínas PvMSP1, PvAMA1, PvMSP10, PfMSP1 y PfGLURP, fueron expresadas en diferentes sistemas de expresión y donadas de otros proyectos para ser utilizadas en esta tesis (Tabla N°01). Las proteínas PvMSP8 y PfrRH2B (dos proteínas nunca antes evaluadas como marcadores de seroprevalencia) fueron expresadas en un sistema de Baculovirus en células de insecto a partir de plásmidos pFastBacDual sintetizados por la empresa GenScript. Por último, la proteína PfMSP10 fue también expresada en un sistema de Baculovirus pero de manera comercial.

Tabla N°01. Antígenos utilizados para su evaluación como marcadores serológicos

	Antígeno	Región	Sistema de expresión
<i>P. vivax</i>	PvMSP1	Merozoite Surface Protein 1	Región Carboxilo terminar 19 kDa
	PvAMA1	Apical Membran Antigen -1	Ectodominio
	PvMSP8	Merozoite Surface Protein 8	Proteína completa
	PvMSP10	Merozoite Surface Protein 10	Proteína completa
			Células Hek-293
<i>P. falciparum</i>	PfMSP1	Merozoite Surface Protein 1	Región N-terminal 42 kDa
	PfGLURP	Glutamic Rich Protein	Región Carboxilo terminal
	PfMSP10	Merozoite Surface Protein 10	Proteína completa
	PfRH2B	Reticulocyte Binding-like Protein 2B	Región variable
			Baculovirus

6.4. Determinación de secuencias para la síntesis de las proteínas

rPvMSP8 y rPfrRH2B y diseño de *Primers*

En esta primera etapa, se llevó a cabo el alineamiento de las secuencias de ADN de los genes de las proteínas PvMSP8 y PfrRH2B de *P. vivax* y *P. falciparum*, respectivamente, reportadas en los bancos de datos del “National Center for Biotechnology Information” de los Estados Unidos (NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para el análisis de las secuencias, se utilizaron los software; MEGA v7.0. y el algoritmo MUSCLE. para la determinación de secuencias con menos polimorfismos, a ser utilizadas en la síntesis de las proteínas recombinantes, como secuencias consenso. A partir de ellas se diseñaron los cebadores de extensión para amplificar y producir las proteínas rPvMSP8 y rPfrRH2B.

Los cebadores de extensión (*primers*) fueron seleccionados utilizando las herramientas de bioinformática Primer3 y OligoAnalyzer 3.1, así mismo los primers seleccionados fueron analizados mediante el BLAST, para revisar que sean específicos y únicos para la secuencia y especie estudiada. Los *primers* se mandaron a sintetizar a la empresa Belomed S.R.L.

Estos *primers* fueron utilizados en un PCR convencional utilizando ADN aislado a partir de sangre de pacientes previamente diagnosticados por PCR como positivos para infección por *P. vivax* y *P. falciparum*, para corroborar la funcionalidad de los primers en la amplificación de las secuencias seleccionadas de las proteínas PvMSP8 y PfrRH2B.

Una vez corroborado la funcionalidad y especificidad de los primers para los genes seleccionados de *pvmSP8* y *pfrh2b*, se realizó la estandarización del PCR, para ello se trabajó con muestras de ADN de cepas referenciales Sal-1 y 3D7 de *P. vivax* y *P. falciparum* respectivamente. Los productos de amplificación fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los ensayos de PCR se llevaron a cabo utilizando la enzima Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase.

6.5. Sistema Baculovirus y expresión eucariota en células de Insecto de las proteínas rPvMSP8 y rPFRH2B

6.5.1. Diseño de los plásmidos pFastBacDual con los genes *pvmSP8* y *pfrh2b*

Seleccionadas las secuencias a utilizar de los genes *pvmSP8* y *pfrh2b*, se mandaron a sintetizar los plásmidos pFastBacDual de cada uno de los genes a la empresa GenScript®, para su clonamiento en *E. coli* DH5α. Para este paso, se utilizó la herramienta SnapGene para el diseño del plásmido pFastBacDual. A cada una de las secuencias se le agregó un sitio de corte para el reconocimiento de las enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI* en los extremos amino y carboxilo terminal respectivamente, así mismo se colocó una cola de histidina en el extremo carboxilo terminal para su posterior purificación. Además, se identificó en cada secuencia la presencia de péptidos señales mediante la herramienta SignalP 4.1 y regiones trans-membrana. Al encontrarse estos dominios, las secuencias correspondientes fueron eliminadas de la secuencia a expresar. En este paso también se realizó una optimización de

codones para cada una de las secuencias de las proteínas de interés.

6.5.2 Clonación de los plásmidos recombinantes pFastBacDual-PvMSP8 y -PfrRH2B en *Escherichia coli* DH5A

6.5.2.1 Transformación de las bacterias *E. coli* DH5 α con el plásmido recombinante pFastBacDual-PvMSP8 y -PfrRH2B

Se utilizó la cepa *E. coli* ElectroMAX™, DH5 α -E™, para la electrotransformación fueron utilizados 80 μ L de las células electrocompetentes y 50pg para cada uno de los plásmidos recombinantes pFastBacDual-PvMSP8 y -PfrRH2B, las condiciones de electroporación fueron de 2.0 kV.

Una vez electroporadas, las células se transfirieron a un 1 mL de medio súper óptimo con represión de catabolitos (S.O.C por sus siglas en ingles) y fueron incubadas en agitación a 225 rpm a 37°C durante 1 hora. Pasada la incubación se realizaron tres diluciones seriadas de la muestra (1:10, 1:100 y 1:1000) con medio S.O.C para ser sembradas en placas de agar Luria Bertani (LB) con ampicilina (100 μ g/mL). Las placas fueron incubadas durante la noche a 37°C.

Como control positivo de transformación 4 μ L del plásmido pUC19 a una concentración final de 40 pg/ μ L. Como control negativo de transformación se utilizó las células no electroporadas a una dilución 1:5.

Una vez terminado el periodo de incubación, se seleccionó colonias definidas y se sembró una colonia por picadura en tubos con 3 mL de LB con ampicilina

100 µg/mL y se llevaron a incubación en agitación a 225 rpm a 37°C por 24 horas.

6.5.2.2 Purificación de plásmidos recombinantes pFastBacDual-PvMSP8 y -PfRH2B

Cada una de las colonias aisladas de *E. coli* DH5a transformadas con los plásmidos recombinantes pFastBacDual-PvMSP8 y -PfRH2B fueron sembradas en 3mL de medio LB con ampicilina (100µg/mL). Estos cultivos fueron utilizados para la extracción de cada uno de los plásmidos recombinantes. Se realizó la extracción haciendo uso del kit “High Pure Plasmid Isolation” (ROCHE®), siguiendo las indicaciones del fabricante con algunas variaciones descritas a continuación.

Los cultivos fueron centrifugados a 2000g por 30seg, se descartó el sobrenadante. El precipitado obtenido fue resuspendido en 250µL de Buffer de suspensión y 250µL de buffer de lisis y se incubaron por 15min a temperatura ambiente. Una vez pasado el tiempo de incubación, se adicionó 350µL de “*Binding Buffer*” y se incubó por 5 min en hielo para luego ser centrifugado a 450g por 10min. Los sobrenadantes obtenidos fueron transferidos a los filtros “*High Pure Filter Tube*”, se centrifugaron a 450g por 60seg y se descartó el líquido filtrado. Se realizaron dos lavados con 700µL de Buffer de lavado mediante centrifugación a 13000g por 1min. Por último, se realizó una elución del plásmido purificado con 100µL Buffer de Elución centrifugándose los tubos a 13000g por 1min.

Los plásmidos purificados fueron cuantificados por fluorometría (Qubit) y visualizados en un gel de agarosa al 1%. Las 2 muestras con las concentraciones más altas fueron enviadas a secuenciar la empresa MacroGen® para verificar que las secuencias de los genes se encuentren sin alteraciones y en el correcto marco de lectura.

6.5.3 Transformación de las bacterias “Max Efficiency™ *E. coli* DH10Bac™”, con los plásmidos recombinantes pFastBacDual-PvMSP8 y -PfrH2B

Para la transformación de las bacterias “Max Efficiency™ *E. coli* DH10Bac™”, se agregó 1 µL del plásmido pFastBacDual recombinante (50ng/uL) en 100uL de bacterias a fin de obtener una concentración final de 50 ng, se homogenizó suavemente y se incubó por 30 minutos en hielo.

Pasada esta etapa, la suspensión fue sometida a shock térmico, colocando el tubo por 45 seg, en baño María a 42°C. Luego se incubó nuevamente por 2 min, en hielo y se le adicionó 900µL de medio S.O.C a temperatura ambiente. La suspensión final fue puesta a incubación a 37°C y en movimiento (225 rpm) por 4 horas.

Seguido de este periodo de incubación se hicieron diluciones seriadas de la muestra con medio S.O.C. (1:10, 1:100 y 1:1000). Se realizó una siembra por superficie con 100µL de cada dilución incluyendo el stock en una placa con agar

LB + Kanamicina (50µg/mL) + Tetraciclina (10µg/mL), Gentamicina (7µg/mL) + X-Gal (100µg/mL) e IPTG (40µg/mL). Finalmente, todas las placas se incubaron entre 24 a 48 horas a 37°C.

La extracción del ADN de los b́acmidos recombinantes de las bacterias transformadas *E. coli* DH10Bac se realiz3 utilizando el kit “QIAGEN Plasmid Midi Kit” siguiendo las indicaciones del fabricante. Se procedi3 a picar dos colonias blancas y dos azules a partir de las placas obtenidas y se inocul3 en 5mL de medio LB que contenía cada uno de los antibi3ticos de selecci3n: Kanamicina (50µg/mL), Tetraciclina (10µg/mL) y Gentamicina (7µg/mL). Estos tubos fueron incubados por 16 horas a 37 °C y en movimiento (250rpm).

Pasado el periodo de incubaci3n, se realiz3 una diluci3n de 1:500 con el medio selectivo (200µL de suspensi3n bacteriana en 100mL de medio de cultivo LB + ATBs). Los cultivos fueron puestos a incubaci3n a 37°C y en movimiento a 225 rpm por 12 a 16 horas para luego proceder con la extracci3n del ADN del b́acmido.

Cada uno de los ADN de b́acmido obtenidos fueron conservados a -80°C los cuales posteriormente fueron corridos en un gel de agarosa al 0.5% a fin de corroborar su integridad.

6.5.4 Cultivo en suspensi3n de c3lulas de insecto de *Spodoptera frugiperda* Sf9

Se descriporeservo células Sf9, estas fueron lavadas por centrifugación con medio “Sf900™ III SFM” por 15 min a 1250g. El precipitado celular se resuspendió suavemente para realizar el conteo celular en una Cámara de Neubauer (NB) utilizando azul de tripan, para determinar el porcentaje de viabilidad (%V) de las células.

Para la suspensión de células Sf9, se recomienda una densidad celular de 3×10^5 cell/mL y un volumen máximo de cultivo de 30 a 50mL para un matraz de 125mL teniendo en cuenta estas indicaciones; la totalidad de las células obtenidas fueron cultivadas en 30mL de medio “Sf900™ III SFM” en un matraz de 125mL. Esta suspensión se llevó a incubación a 27°C con agitación a 150rpm por 4 días.

6.5.5 Transfección de las células de insecto Sf9 con los bacmidos recombinante para las proteínas PvMSP8 y PfrRH2B

Al día 4 del cultivo de las células Sf9, se obtuvo una densidad celular de 1.55×10^6 cél/mL con una viabilidad del 95.4%. Estas células se utilizaron para la transfección con los b́acmidos recombinantes para cada proteína. En una placa de 6 pocillos para cada proteína, se cultivaron 2×10^6 células/pocillo por 15min a temperatura ambiente para permitir que las células se adhieran a la placa.

Luego de preparar las diluciones de los b́acmidos, estas fueron adicionadas a 108uL de “Cellfectim™ II” con un volumen final de 210uL y se incubó por 30min a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, la mezcla de

bacmido y Cellfectim se adicionó gota a gota a los pocillos correspondientes y se incubaron a 27°C por 3 horas. Por último, se aspiró el sobrenadante de cada pocillo y se agregó 2mL de medio Sf900™II SFM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%. Las placas fueron incubadas por 96 horas a 27°C.

Con el objetivo de corroborar la transfección de las células con los b́acmidos recombinantes para las tres proteínas, se realizó el procesamiento de los cultivos. Se cosechó el contenido total de cada pocillo y se centrifugó a 900g por 10min. El sobrenadante, conteniendo el P1 de Baculovirus, se le agregó 2% de suero fetal bovino y se almacenaron a -80°C. El P1 de Baculovirus se utilizó posteriormente para la producción del stock de Baculovirus. Al precipitado celular obtenido se le adicionó 50uL de buffer de Lisis (Tris 50mM pH7.7, NaCl 300mM, Glicerol 0.5%, PMSF 0.2mM, Triton X-100 0.1%), se homogenizó por 10min a fin de lisar todas las células y se incubó por 20min a -20°C. Luego, los tubos fueron centrifugados por 10min a 3300g a 4°C. Tanto el precipitado como el sobrenadante fueron almacenados a -80°C. La producción de las proteínas recombinantes PvMSP8 y PfrRH2B se evaluó mediante una corrida electroforética en gel de poliacrilamida y Western Blot con anticuerpos anti-His. “Monoclonal Anti-PolyHistidine Peroxidase” (Conjugado Anti-His) a una concentración 1:1000 y se incubó por 4 horas en movimiento a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron 4 veces con solución de lavado (Buffer fosfato salino (PBS) Tween20 0.01% pH7.5) por 5 min en movimiento. Se revelaron con sustrato “SigmaFast™ DAB” hasta observar las bandas. La reacción se detuvo con agua destilada.

6.5.6 Amplificación del stock de los Baculovirus recombinantes para las proteínas PvMS8 y PfRH2B.

Luego de 96 horas de cultivo de las células Sf9 con cada uno de los bacmidos PvMS8 y PfRH2B, se colectó el sobrenadante que contiene el stock de Baculovirus P1 y se realizó un *pool* de todo lo cosechado en los diferentes pocillos. Estos stocks se almacenaron a 4°C para su posterior amplificación.

Para la amplificación, se realizó la infección de las células Sf9 como se detalla anteriormente. Se asumió un título viral del P1 de 1×10^6 pfu/mL y se utilizó un valor de multiplicidad de infección (por sus siglas en inglés MOI) de 0.1 (Life-Technologies, 2015). Con esto, se calculó que el inóculo requerido fue de 0.2mL. Las células fueron incubadas luego de la infección por 48h a 27°C. El sobrenadante se centrifugo a 500g por 5min y se almacenó el sobrenadante resultante conteniendo el stock de Baculovirus P2 a 4°C.

6.5.7 Cuantificación del stock de Baculovirus recombinante PvMS8 y PfRH2B

Para la cuantificación del stock de Baculovirus P2 se realizó un ensayo de placa. Placas de 6 pocillos fueron utilizados, se cultivaron 2mL de células Sf9 a una concentración de 5×10^5 células/mL y se incubaron por 1 hora para permitir que se adhieran. Además, se realizaron 6 diluciones seriadas (10^{-2} a 10^{-7}) del stock viral P2 de cada una de las 3 proteínas. Finalizada la incubación, se retiró el sobrenadante y se agregó 1mL de cada una de las 6 diluciones al pocillo

correspondiente y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Una vez terminado el proceso de infección, se removió el sobrenadante de cada pocillo y se agregó 2mL de medio Sf900™II con 1% de agarosa y se dejó gelificar para luego ser incubadas a 27°C de 5 días o hasta observar formación de placas, las cuales se observan como zonas redondeadas libres de células.

La determinación del título viral del inóculo se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{PFU/mL del Stock} = \frac{1}{\text{Factor de Dilución}} \times \frac{1}{\text{mL de Inóculo/placa}} \times \text{N}^\circ \text{ de Placas}$$

6.5.8 Evaluación de la multiplicidad de infección y el tiempo de infección para la expresión de las proteínas recombinantes PvMSP8 y PfrH2B

Para determinar las condiciones óptimas de infección; cantidad de virus necesario para la infección de las células de insecto Sf9 (MOI) y el tiempo necesario para la infección (TOI), se siguieron las recomendaciones del manual “Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System” (Life- Technologies, 2015), se evaluaron los MOIs de 0.1, 0.5 y 1 y TOIs de 2, 3 y 4 días para cada proteína.

Los ensayos de infección se realizaron como se detallan más arriba, utilizando los MOIs y TOIs recomendados. Al día 2, 3 y 4 se cosecharon los cultivos e inmediatamente se realizó la extracción de proteínas. Todas las muestras fueron almacenadas a -80°C. Una vez obtenidos todos los lisados celulares se realizó

la evaluación de la producción de proteínas recombinantes mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y ensayo de Western Blot con anticuerpos anti-PoliHis.

6.5.9 Escalamiento del sistema de producción y purificación de las proteínas recombinantes PvMSP8 y PfrH2B

En un frasco estéril conteniendo 170mL de medio de cultivo, se colocó 1.7×10^8 células Sf9 (1×10^6 cells/mL). Luego se adicionó el inóculo viral con los MOI determinados en el paso anterior para cada proteína (Figura N°06).

Se procedió a instalar el sistema de purificación y a preparar los buffers para este sistema recomendados por la casa comercial (Tabla N°02). Una vez instalado, se procedió a equilibrar los cartuchos con 25mL de Buffer de lavado 1 y se dejó fluir a una velocidad de 2 mL/min. Luego se hizo pasar la muestra (muestra resultante del centrifugado de la extracción de proteínas) y se colectaron fracciones de 2mL. Cada fracción obtenida en este paso se etiquetó proteína no unida. Se realizó un primer lavado del cartucho con 30 mL de buffer de lavado 1 y se dejó fluir a la misma velocidad colectando de igual manera fracciones de 2mL. Estas fracciones se rotularon como Lavado 1. Luego se realizó un segundo lavado con 30 mL de buffer de lavado 2 colectando nuevamente fracciones de 2mL. Cada microtubo se etiquetó como Lavado 2.

Tabla N°02. Composición de los Buffers para el Sistema de purificación Bio-Scale™ Mini Profinity™ IMAC Cartridges – BioRad

Buffer	KCl	K₂PO₄	Imidazole
Buffer de lavado 1	300mM/ 22.37g	50 mM / 6.8g	5mM / 0.34g
Buffer de lavado2	300mM/ 22.37g	50 mM / 6.8g	10 mM / 0.68g
Buffer de Elución	300mM/ 22.37g	50 mM / 6.8g	250 mM / 17.02g

Finalmente, las proteínas recombinantes fueron eluidas con 50mL de Buffer de Elución, colectándose fracciones de 2mL, todas las fracciones colectadas fueron almacenadas en frío. Para evaluar la pureza e integridad de las proteínas recombinantes, se realizó una electroforesis a 10% SDS-PAGE, utilizando 5uL de cada fracción, estas fueron resueltas en la electroforesis, seleccionándose las fracciones que presentaban una mayor presencia y pureza de la proteína recombinante purificada.

6.5.10 Concentración y cuantificación de las proteínas recombinantes

PvMSP8 y PfrRH2B purificadas a homogeneidad

Se seleccionaron todas las fracciones conteniendo una mayor cantidad y pureza de la proteína recombinante, se concentró utilizando un sistema de filtración por centrifugación (Amicon® Ultra-15, Merck) de la siguiente manera: Antes de su uso, el filtro fue hidratado con 15 mL de agua ultra pura (MilliQ), centrifugándose a 5000g por 10 min. Luego las fracciones seleccionadas fueron añadidos al filtro (volumen máximo 15mL), se centrifugó a 5000g por 20 minutos, colectándose la proteína recombinante concentrada, que fue corrida en un gel 10% SDS-PAGE a fin de evidenciar el resultado del proceso, finalmente la concentración de la proteína recombinante concentrada, fue determinada por fluorometria (Qubit™, Invitrogen™).

6.6 Evaluación de la seroreactividad de proteínas recombinantes PvMSP1, PfMSP1, PvMSP8, PvMSP10, PfMSP10, PfrRH2B, PvAMA1 y PfGLURP mediante ensayos de ELISA

Una vez obtenidas las proteínas recombinantes PvMSP8 y PfrRH2B mediante un sistema de expresión en células de insecto, se procedió a realizar la estandarización del ensayo de ELISA probando diferentes concentraciones de antígenos fijados en placa, diferentes diluciones de sueros y de anticuerpo conjugado anti-IgG. Una vez determinados las condiciones óptimas se realizaron los ensayos de ELISA con las muestras de sueros de controles positivos para infección por *P. vivax* y *P. falciparum*, respectivamente, y controles negativos endémicos y no endémicos. Con algunas variantes detalladas a continuación, se realizó el mismo procedimiento para las proteínas PvMSP1, PvAMA1, PvMSP10, PfMSP1, PfGLURP y PfMSP10.

Este ensayo se utilizó para determinar si las proteínas sintetizadas son reconocidas por anticuerpos circulantes de pacientes infectados, buscando diferencias significativas con los sueros de pacientes controles negativos.

6.6.1 Estandarización de ensayo de ELISA para las proteínas recombinantes PvMSP1, PfMSP1, PvMSP8, PvMSP10, PfMSP10, PfrRH2B, PvAMA1 y PfGLURP

Para medir los niveles de IgG específicos, en la estandarización de ELISAs, con las proteínas PvMSP8 y PfrRH2B se probaron tres concentraciones de antígeno,

0.001mg/mL, 0.005mg/mL y 0.01mg/mL en PBS 0.1M, pH 7.4. Se colocaron 100uL a la placa (Costar® High Binding) y se incubó toda la noche a 4°C. Luego se lavó y se bloqueó con 200uL de PBS 0.1% BSA por 1 hora a temperatura ambiente. Se utilizaron 2 sueros controles positivos y un pool de sueros positivos de pacientes confirmados por PCR y con resultados previos de Densidad Óptica (DO) positivos altos para otros antígenos en ELISA con infección por *P. vivax* (Pool (+) Pv, PV26 y PV36) y *P. falciparum* (Pool(+)Pf, S27 y S31), un pool de sueros negativos de individuos sin historias previas de viaje a zonas endémicas de malaria y un suero control de negativo de zona endémica. Todos los sueros se probaron a 3 diluciones: 1/100, 1/400 y 1/500 diluidos en solución AB (0.15 M NaH₂PO₄; 0.15 M Na₂HPO₄, 0.5 M NaCl; 0.05% Tween 20, 0.05% BSA, 1.5% leche descremada) y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó 4 veces con solución AB y se probaron dos concentraciones del conjugado IgG anti-Humano con HRP (Jackson Immuno Research®) 1/1000 y 1/2000. Se incubó una hora a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con PBS Tween 0.05% para agregar el sustrato de revelado 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB), se permitió reaccionar por 7 minutos y se paró la reacción con 50 µL de HCL 0.25M. Todos los sueros se probaron en duplicado.

En el caso de las proteínas PvMSP10 y PfMSP10, el ensayo de ELISA con el protocolo descrito ya fue estandarizado en proyectos anteriores.

Las proteínas PvMSP1, PvAMA1, PfMSP1 y PfGLURP, expresadas en

diferentes sistemas, ya han sido probadas y estandarizadas en ensayos de ELISA con diferentes protocolos en nuestro grupo de investigación. Sin embargo, para que los resultados fueran comparables con las proteínas sintetizadas como objetivos de esta tesis, se realizó una estandarización para ser utilizadas con el protocolo detallado más arriba. Para esto, se probaron las proteínas con tres concentraciones para ser fijadas en las placas, 0.0005 mg/mL, 0.001 mg/mL y 0.002 mg/mL y tres diluciones seriadas de sueros; 1/100, 1/200 y 1/400 con tres controles positivos para infección por *P. vivax* y *P. falciparum*, respectivamente y tres controles negativos.

En un segundo ensayo de estandarización, se probó una curva de diluciones seriadas de sueros para determinar la concentración óptima de las muestras para trabajar con cada una de las proteínas. Las diluciones utilizadas, tanto para los controles positivos como para los negativos, fueron de 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600 y 1/3200.

6.6.2 Evaluación de la seroreactividad de proteínas recombinantes PvMSP1, PfMSP1, PvMSP8, PvMSP10, PfMSP10, Pfrh2B, PvAMA1 y PfGLURP mediante ELISA con sueros controles

Luego de estandarizar los ensayos de ELISA para IgG específicos contra las proteínas recombinantes, se procedió a correr las muestras de suero colectadas de pacientes positivos a *P. falciparum* y *P. vivax* por PCR y controles sanos para determinar si existe reactividad y diferencias entre la respuesta humoral contra los antígenos estudiados entre los grupos de estatus clínico.

Se incubaron las placas a 4°C durante toda la noche con 100µL por pozo de las proteínas diluidos en PBS (0.1 M, pH 7.4) a una concentración de 0.0005mg/mL para PvMSP1, PvAMA1, PvMSP8, PvMSP10, PfGLURP y PfMSP10, y 0.001mg/mL para PvMSP10 y PfMSP1. Se trabajaron todos los sueros por duplicado. Al día siguiente se lavó una vez con PBS-T, se agregó la solución de bloqueo y se incubó por una hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas con PBS-T 3 veces y se colocaron los sueros a una dilución 1/400 diluidos en solución AB y se dejó incubar por una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 4 veces con solución PBS-T y se adicionó el conjugado para IgG (dilución 1/2000 v/v en solución AB) y se incubó a temperatura ambiente protegidas de la luz. Se lavaron 3 veces con solución AB y se revelaron con TMB por 7 minutos. La reacción se paró con 50µL de HCL 0.25M y se leyó inmediatamente en un lector de placas a una longitud de onda de 450nm. Cada placa incluyó dos sueros controles positivos por PCR para infección por *P. falciparum* probados anteriormente en la estandarización, un control negativo, un control de placa sin antígeno fijado ni suero y un blanco con antígeno fijado en la placa, pero al que no se le colocó suero alguno. El punto de corte para determinar un suero como positivo se definió por dos veces la desviación estándar del valor de OD de los controles negativos

6.7 Ensayo LUMINEX multiplex con las proteínas recombinantes PvMSP1, PfMSP1, PvMSP8, PvMSP10, PfMSP10, PfrRH2B, PvAMA1 y PfGLURP

El ensayo de Luminex multiplex permite la detección de anticuerpos contra múltiples antígenos en sueros de pacientes en un solo pocillo, dando como resultados la respuesta individual a cada antígeno evaluado. De esta manera, hace posible un análisis más eficiente utilizando cantidades mínimas de suero y reactivos. Más aún, el rendimiento de Luminex, ha sido reportado como comparable con ensayos de ELISA para la medición de anticuerpos, citoquinas y otros componentes biológicos en una variedad de enfermedades (Elshal, 2006; Kingsmore, 2006; Moncunill, 2014). Entre otros de las ventajas que presentan los ensayos de Luminex, tenemos también 1) un rango dinámico más amplio, que suele ser superior a tres órdenes de magnitud, pero que dependerá de la selección correcta del anticuerpo secundario; 2) una cinética óptima, debido al movimiento constante de las esferas en suspensión, lo que facilita que ocurran las reacciones y que se den de manera mucho más rápida en comparación con la cinética en fase sólida; y 3) la reducción de uniones no específicas, como resultado de la conjugación de las proteínas en donde se incluyen agentes bloqueantes y pasos de activación (Elshal, 2006; Kingsmore, 2006; Luminex).

6.7.1 Unión covalente de las proteínas recombinantes PvMSP1, PfMSP1, PvMSP8, PvMSP10, PfMSP10, PfrRH2B, PvAMA1 y PfGLURP a las perlas magnéticas

El primer paso para empezar la estandarización de este ensayo, es la unión de

las proteínas recombinantes a esferas magnéticas internamente coloreadas que permiten la detección diferenciada de respuesta a diferentes antígenos. Este acoplamiento se da por medio de unión covalente del grupo carboxilo de las esferas con el grupo amino de las proteínas de interés.

Se trabajó con las perlas magnéticas (MagPlex® -C Microspheres. Luminex Corp.) en una concentración stock de 1.25×10^7 perlas/mL y el acoplamiento con las proteínas se realizó utilizando el kit Bio-Plex® COOH Beads Amine Coupling (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Antes de empezar a trabajar, las perlas fueron agitadas rigurosamente en un *vortex* por 30seg y sonicados por 30 seg. Se tomó 100 μ L del stock para trabajar con 1.25×10^6 perlas para el acoplamiento de las proteínas y se colocó en un rack magnético por aproximadamente 1 min o hasta observar que las perlas se hayan agregado y se descartó el sobrenadante. Luego, se agregó 100 μ L del buffer de lavado proporcionado por el kit y se volvió a colocar los viales en el rack magnético para decantar el sobrenadante.

Las esferas fueron resuspendidas en 80 μ L de Buffer de activación y se agitaron vigorosamente en un *vortex* por 30seg. Inmediatamente antes de ser usadas, se prepararon las soluciones de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) y de N-hidroxisulfosuccinimida (S-NHS) a 50mg/mL cada una en agua MiliQ estéril. Se agregó 10 μ L de la solución de S-NHS y 10 μ L de la solución de EDC a cada vial y se incubó por 20min protegidos de la luz en un rotatorque. Después de la incubación, se realizaron dos lavados con 150 μ L de PBS pH 7.4

y se resuspendieron las esferas en 100µL de PBS. Las proteínas fueron agregadas según las cantidades indicadas más adelante en la etapa de estandarización y se ajustó a un volumen final de 500µL con PBS. Los viales fueron incubados protegidos de la luz a 4°C durante toda la noche en movimiento. Pasada la incubación, se colocaron los viales en el rack magnético para descartar el sobrenadante y se lavó con 500µL de PBS. Las perlas con las proteínas acopladas fueron resuspendidas en 250µL de Buffer de bloqueo y se incubaron en agitación por 30min protegidas de la luz. Luego, las esferas fueron lavadas con 500µL de buffer de almacenamiento. Finalmente, las perlas acopladas se resuspendieron en 150µL de buffer de almacenamiento y se conservaron a 4°C protegidas de la luz hasta su uso

6.7.2 Estandarización de un ensayo Luminex multiplex con las proteínas recombinantes PvMSP1, PfMSP1, PvMSP8, PvMSP10, PfMSP10, Pfrh2B, PvAMA1 y PfGLURP

Una vez obtenidos las perlas ya unidas covalentemente a cada una de las proteínas recombinantes en diferentes concentraciones se procedió a la estandarización del ensayo de Luminex multiplex. Para esto, se determinó la concentración adecuada de proteínas para ser acoplada a las perlas. Las concentraciones óptimas para cada proteína se definieron experimentalmente en función de la reactividad de cada una a una curva estándar hecha de un “pool” de sueros de pacientes con infección activa por *P. falciparum* y *P. vivax*, respectivamente determinados por PCR. Con esto, se buscó conseguir que cada analito tuviera un rango dinámico amplio y lineal, de modo que la fluorescencia

de cualquier muestra experimental caiga dentro del rango dinámico del ensayo. Posteriormente, en el ensayo con muestras del barrido poblacional, se incluyó en cada placa dos curvas, una para *P. vivax* y otra para *P. falciparum* de diluciones de estos sueros utilizados en la estandarización. Este enfoque permite no solo aumentar la capacidad de rendimiento combinando proteínas de antigenicidad diferente en la misma matriz y trabajarlas juntas en la misma dilución de muestra, sino también reducir significativamente la cantidad de proteínas necesarias para todo el estudio y normalizar los resultados entre placas. Las cantidades probadas para cada proteína se detallan en resultados.

Las perlas acopladas con las proteínas recombinantes fueron probadas en un ensayo de Luminex con un “pool” de siete sueros positivos y un “pool” de siete sueros negativos previamente probados en los ensayos de ELISA detallados anteriormente. En esta etapa, cada perla se trabajó por separado.

Se realizaron diluciones seriadas del “pool” positivo desde 1/50 a 1/102400 y una dilución de 1/100 para el suero control negativo diluidas en buffer PBT (PBS pH 7.4, 1% BSA, 0.05% Tween) en un volumen final de 50µL. También se consideró un blanco con solo buffer PBT para cada una de las perlas. Las muestras fueron agregadas a las placas (Bio-Plex Pro™ Flat bottom Plates) y se le adicionó 0.1µL de perlas a cada pocillo llevando a un volumen final de 100µL en buffer PBT. Las placas fueron incubadas por 30min a temperatura ambiente protegidas de la luz y en movimiento constante. Pasado el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados con buffer PBT y se utilizó una placa magnética para

decantar el sobrenadante. El anticuerpo secundario anti – IgG 1mg/mL (donkey F(ab')₂ anti-human IgG Fc R- PE, Jackson Immunoresearch) se diluyó en 1/100 y se agregó 100µL a cada pocillo y se dejó incubar protegido de la luz por 15min en movimiento. Finalmente, se realizaron tres lavados con buffer PBT y las muestras fueron resuspendidas en 100µL de buffer PBT y se dejó incubar por 5min protegidos de la luz en movimiento antes de su lectura. Las placas fueron leídas en un equipo Luminex® 200™ proporcionado por el Dr. Victor Neyra del Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular, del Hospital Cayetano Heredia. Se consideró un conteo de 50 perlas por analito y los resultados se obtuvieron como Intensidad de Fluorescencia Media (MFI por sus siglas en ingles).

6.7.3 Evaluación de las proteínas recombinantes PvMSP1, PfMSP1, PvMSP8, PvMSP10, PfMSP10, PFRH2B, PvAMA1 y PfGLURP como posibles marcadores de transmisión

Para determinar si las proteínas recombinantes podrían ser utilizadas como marcadores serológicos para medir la transmisión de malaria en la Amazonía peruana, se utilizaron 421 sueros de un barrido poblacional de dos comunidades de la región de Loreto; 258 de Cahuide y 163 de Lupuna. Estos sueros fueron analizados mediante un ensayo multiplex de Luminex con las ocho proteínas recombinantes utilizando el protocolo detallado en el punto 3.9.2. Cada una de las placas incluyó dos curvas de sueros positivos, una para *P. vivax* y una para *P. falciparum*, un blanco y un “pool” de sueros negativos, estos dos últimos como controles de placas trabajados en duplicado. El equipo utilizado para estos

ensayos fue un Magpix® (Luminex™) proporcionado por el Dr. Domingo Gonzalo del instituto PATH (Seattle, USA).

6.8 Plan de análisis

Ya que los niveles de anticuerpos en sueros no tienen una distribución normal, se utilizará para el análisis estadístico la prueba no paramétrica Mann-Whitney U test para determinar si existen diferencias significativas entre los grupos de estatus clínico y controles negativos.

Para el caso del estudio de las proteínas como marcadores de exposición en un ensayo Luminex multiplex, se utilizó una curva de diluciones seriadas de sueros positivos en cada placa para ser utilizada como curva estándar para realizar una cuantificación relativa de los sueros probados. Este análisis será posible solo para las proteínas con las que se haya conseguido una curva con regresión logística de 5 parámetros. El uso de estas curvas estándares nos permite también normalizar los resultados de placa a placa.

Debido a que no se consiguió determinar la concentración adecuada de proteína en la unión covalente a las perlas magnéticas para lograr una curva estándar lineal, se trabajó el análisis con los valores MFI resultante para cada antígeno en base logarítmica para tener una distribución normal de los resultados. Para las comparaciones de los niveles de IgG se utilizó el test de ANOVA o T-test, según corresponda. Por último, se realizó una regresión logística multivariada para determinar las variables asociadas a los títulos de anticuerpos.

7. RESULTADOS

7.1 Análisis de secuencias de los genes *pvmsp8* y *pfrh2b*

El análisis se llevó a cabo para determinar las características de las secuencias de los genes *pvmsp8* y *pfrh2b* a ser utilizadas para su expresión en células de insecto. La secuencia del gen *pfrh2b* reportada en las base de datos del NCBI y plasmODB contiene 9765 bp y codifica para una proteína de 3179 aa, para la cepa 3D7 de *P. falciparum*. Debido a su alto grado de homología a la proteína RH2a sólo se analizó la región variable. Además, se realizó un alineamiento de secuencias de aminoácidos de las proteínas resultantes para los genes seleccionados en búsqueda de polimorfismos, no se encontraron mayores polimorfismos en las secuencias extraídas. Con estos análisis, se utilizó la secuencia variable del gen *pfrh2b* (1998 pb), para la cepa 3D7 para la síntesis de la proteína PfRH2B (Anexo 1).

De la misma manera, se analizó la secuencia del gen *pvmsp8*, esta codifica para una proteína de 487 aa, para la cepa SalI de *P. vivax*. Se observó, mediante análisis de secuencias para este gen reportadas en el banco de datos, que presentan muy pocas variaciones a nivel de aminoácidos por lo que son proteínas muy conservadas en *P. vivax*. Para la síntesis de la proteína recombinante de PvMSP8 se seleccionó el gen de la cepa SalI (Anexo N°02).

7.2 Identificación de las secuencias seleccionadas para los genes *pvmsp8* y *pfrh2b* en muestras de aislados de parásitos *P. falciparum* y *P. vivax* de la Amazonía peruana

Ya seleccionadas las secuencias para los genes de *pvmsp8* y *pfrh2b*, se procedió a determinar si efectivamente dichas secuencias se encuentran presentes en parásitos *P. vivax* y *P. falciparum*, respectivamente, provenientes de aislados de la Amazonía peruana. Para esto, el primer paso fue la selección de primers para cada una de las secuencias. Los primers definidos se muestran en la tabla N°03.

Tabla N°03. Primers diseñados para la amplificación de las tres proteínas de interés

	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')
PvMSP8	ATGAGGAAAAACGCGCAAATAGTAAT	CTAGAACAGGTACAGGCACAAAAGC
PfRH2B	AATGATATAAAGGATCTTGGTGATG	AATACATTTATATTGTGTGTATTCTATA

Con estos primers, se realizó la estandarización del PCR con ADN de cepas referenciales, 3D7 (*P. falciparum*) y Sal1 (*P. vivax*). La temperatura óptima de hibridación de los primers para amplificar los genes *pvmsp8* y *pfrh2b* fue de 57.1°C y 50°C respectivamente.

Bajo las mismas condiciones de PCR, determinadas para cada uno de los genes *pvmsp8* y *pfrh2b*, se realizó la amplificación de estos genes utilizando ADN extraído de cultivos de parásitos de *P. falciparum* (n=2) y ADN extraído de muestra de pacientes con infección activa por *P. vivax* (n=8). Los genes *pvmsp8* y *pfrh2b* amplificaron en todas las muestras de ADN extraídas de aislados provenientes de la Amazonía peruana, demostrando que los genes se encuentra en las cepas de *Plasmodium spp.* peruanas (Fig. N°04). Con estos resultados, se

confirmó el uso de estas secuencias de los genes *pvmSP8* y *pfrh2b*, solicitando la síntesis de los plásmidos pFastBacDual a la empresa GenScript.

7.3 Transformación de bacterias *E. coli* DH5a con el plásmido pFastBacDual de las proteínas PvMSP8 y PfrH2B

Una vez obtenidos los plásmidos, se llevó a cabo la transformación de las bacterias *E. coli* DH5a con los plásmidos pFastBacDual específicos para las proteínas PvMSP8 y PfrH2B, lográndose obtener colonias aisladas en ambos casos. Cinco colonias fueron seleccionadas aleatoriamente para cada uno de los plásmidos, fueron sembradas en 3mL medio LB con ampicilina. Estas bacterias fueron utilizadas para la extracción de los plásmidos. Además, se realizó la cuantificación de cada uno de los plásmidos obtenidos a fin de obtener su concentración. Los resultados se muestran en la tabla N°04.

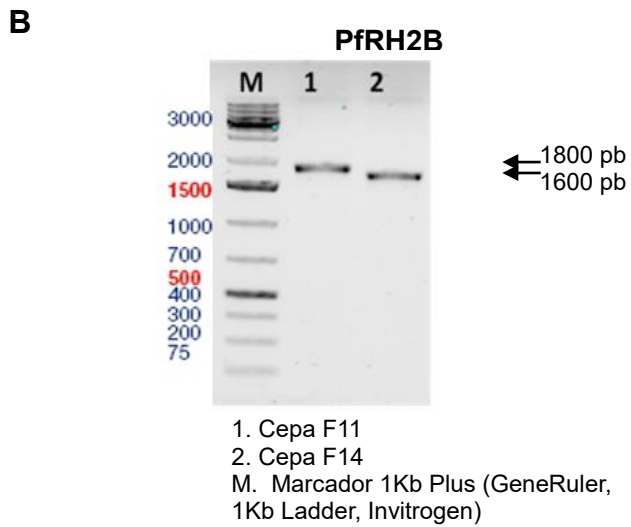
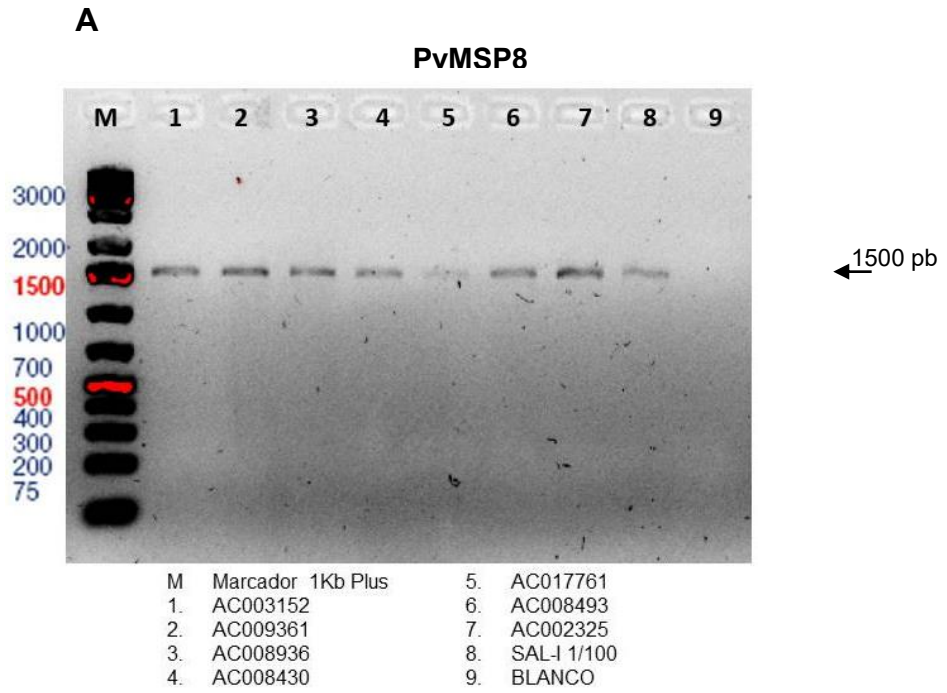


Figura N°04. Amplificación de los genes *pvmSP8* y *pfrh2b* en ADN de aislados de parásitos de la Amazonia peruana. Productos de PCR del gen *pvmSP8*, a partir de ADN obtenidos de pacientes infectados con malaria vivax, así como de la cepa referencial de *P. vivax*, Sal-1; Carriles 1-8 y 9 respectivamente (A). Productos de amplificación del gen *pfrh2b*, a partir de ADN obtenido de cultivos de parásitos de *P. falciparum*; carriles 1-2 (B).

Tabla N°04. Cuantificación por Fluorometría (Qubit, Invitrogen) del ADN de los plásmidos purificados ($\mu\text{g/mL}$)

	PvMSP8	PfRH2B
Colonia 1	32.2	57.0
Colonia 2	53.0	58.0
Colonia 3	54.0	57.0
Colonia 4	52.5	54.5
Colonia 5	52.0	51.5

De los plásmidos obtenidos se seleccionó el producto de 2 colonias a fin de realizar el secuenciamiento de estos y corroborar la inserción del plásmido que contiene la secuencia de cada una de las proteínas de interés. Todos los genes se encontraron sin alteraciones y en el marco de lectura correcto.

7.4 Obtención del Bámido recombinante para las proteínas PvMSP8 y PfRH2B en *E. coli* DH10BAC

Luego de la clonación de bacterias “Max Efficiency™ *E. coli* DH10Bac™” con el plásmido “pFastBacDual” de las proteínas PvMSP8 y PfRH2B se pudo observar el crecimiento de colonias blancas y azules. Las colonias DH10Bac de *E. coli* recombinantes se caracteriza por su resistencia a los antibióticos Kanamicina, Tetraciclina y Gentamicina y por la ausencia de la coloración en presencia del IPTG y X-Gal. Por tal motivo; para la extracción del bacmido recombinante, se seleccionaron las colonias blancas y una colonia azul como control negativo de transformación. Se puede observar la presencia del bámido en todas las muestras. Estos bacmidos serán utilizados para la transfección de células *Spodoptera frugiperda* Sf9 y la obtención de los Baculovirus.

7.5 Transfección de las células de insecto Sf9 con los bácmidos recombinantes PvMSP8 y PfrRH2B y cuantificación de los stocks de Baculovirus recombinante

Las células de insecto Sf9 transfectadas con los bácmidos recombinantes PvMSP8 y PfrRH2B. Para evaluar la transfección, se llevó a cabo la lisis celular para posteriormente evaluar la producción de las proteínas PvMSP8 y PfrRH2B; a través de la electroforesis y Western Blot con anticuerpos dirigidos a la cola His presente en cada proteína recombinante.

Se logró obtener la expresión de las proteínas recombinantes PvMSP8 y PfrRH2B (Fig. N°05) con todas las concentraciones de bácmido probadas.

Con el stock de Baculovirus recombinante P2, se realizó la cuantificación por ensayo de placa de dicho stock obteniendo una concentración de 2.3×10^8 pfu/mL para ambas proteínas, siendo óptimas para continuar con los ensayos de expresión. Esta concentración determinada es importante ya que nos permitirá calcular los MOI y TOI óptimos para la infección de las células Sf9

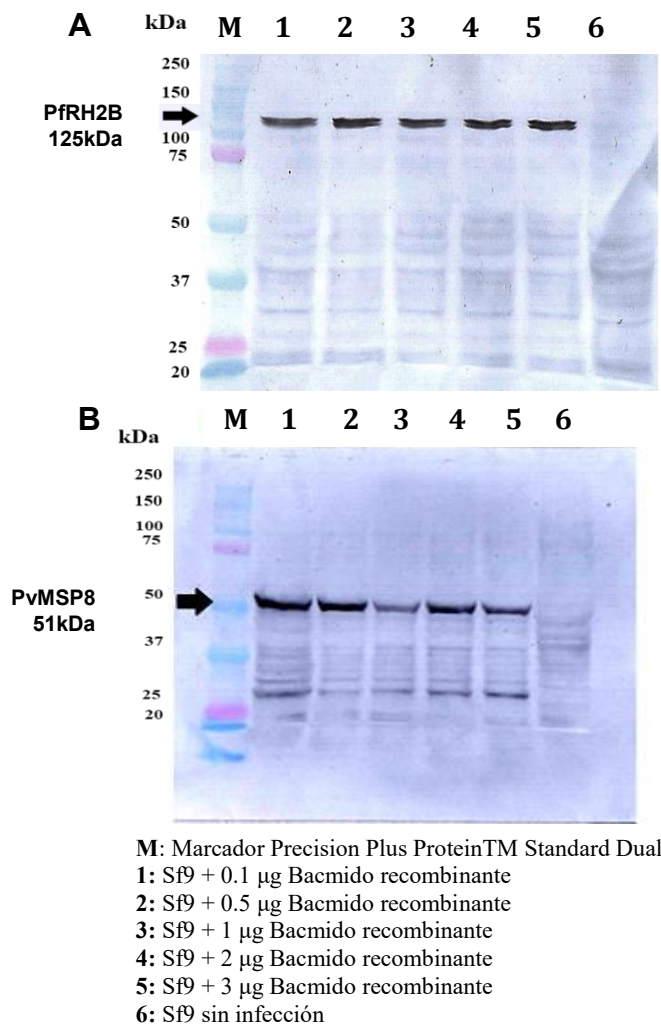


Figura N°05. Ensayo de Western Blot para la detección de las proteínas recombinantes PFRH2B y PvMSP8. Las células Sf9 fueron transfectadas con las cantidades indicadas de b́acmidos recombinantes para la expresi3n de las prote3nas recombinantes PFRH2B (A) y PvMSP8 (B) (Las bandas correspondientes a las prote3nas se indican con las flechas negras), se incluy3 un control negativo de c3lulas Sf9 sin infecci3n. La detecci3n se realiz3 con anticuerpos Anti-His.

7.6 Expresi3n, escalamiento de la producci3n y purificaci3n de las prote3nas recombinantes PvMSP8 y PFRH2B

Mediante la evaluaci3n de MOI y TOI se pudo determinar que se defini3 que el MOI 3ptimo para la expresi3n de PvMSP8 es de 1 a las 48h (TOI D2) (Fig. N°06A) y MOI 0.5 a las 24 horas post-infecci3n (TOI D2) para PFRH2B (Fig. N°06B). Las condiciones aqu3 determinadas para la expresi3n de las prote3nas

fueron utilizadas para el escalamiento del sistema y, de esta manera, obtener mayor cantidad de proteína recombinante que será utilizada para los demás objetivos de este proyecto.

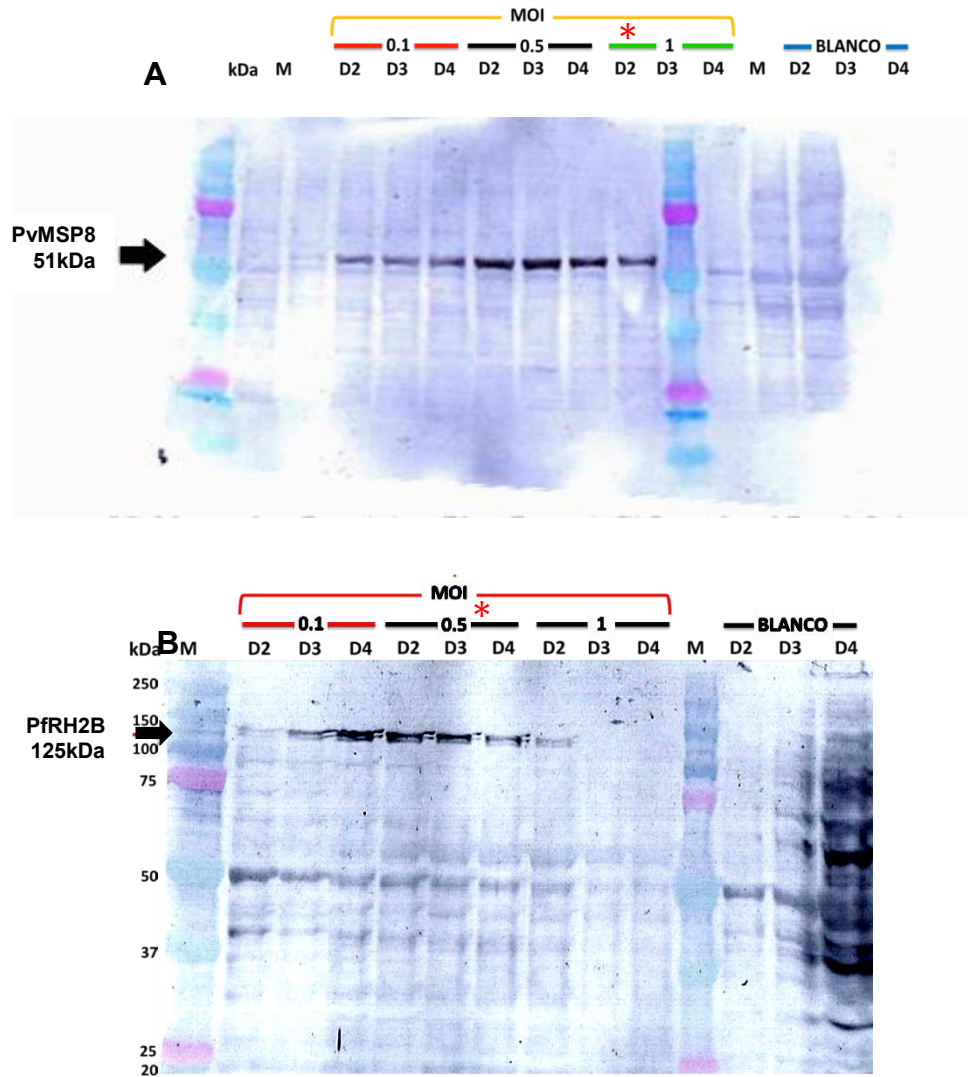


Figura N°06. Expresión de las proteínas recombinantes PvMSP8 y PfrH2B. Se probaron 3 MOIs 0.1, 0.5 y 1, y 3 TOIs, 48 horas (D2), 72 horas (D3) y 96 horas (D4) para las proteínas rPvMSP8 (A) y rPfrH2B (B). Además, se incluyeron los lisados de células Sf9 sin infección para cada uno de los TOIs como controles negativos (BLANCO). La flecha indica la banda correspondiente a la proteína. El “*” Indica los MOIs y TOIs seleccionados para cada proteína recombinante..

Luego del escalamiento de la producción de proteína y verificada la expresión de la proteína mediante Western Blot, se procedió a purificación

de las proteínas. Finalmente se realizó un pool de las fracciones de purificación 2, 3 y 4, ya que contenían la mayor cantidad de proteína expresada. Fueron concentradas obteniéndose una concentración final de de 428 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína rPvMSP8 y de 8 mg/mL de proteína rPfrRH2B (Fig. N°07).

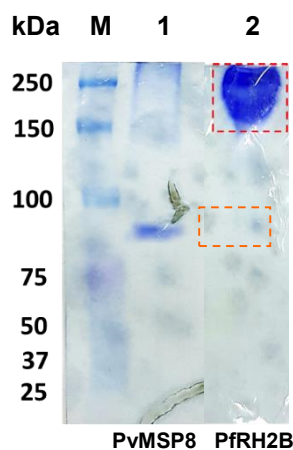


Figura N°07. Purificación de las proteínas rPvMSP8 y rPfrRH2B. Se realizó una electroforesis SDS-PAGE al 10%, de las fracciones eluidas de las proteínas purificadas. M: Marcador Precision Plus Protein™ Dual Color, Carril 1: Proteína PvMSP8, Carril 2: Proteína PfrRH2B. Las proteínas se indican dentro del recuadro rojo.

7.7 Estandarización del ensayo de ELISA para evaluar los niveles de IgG específicos contra las proteínas recombinantes PvMSP8 y PfrRH2B

Antes de poder evaluar la sero-reactividad de los antígenos, se realizó la estandarización del ensayo de ELISA para cada una de las proteínas recombinantes. En la fig.N°08 se muestran las concentraciones óptimas de antígeno y conjugado, en la evaluación de respuesta de anticuerpos IgG contra rPvMSP8 y rPfrRH2B en pacientes con infección activa y controles sanos. Se buscaron las concentraciones que generen un bajo *background* en los blancos y sueros negativos, así como valores de OD altos para los controles positivos. Con

estos resultados, se decidió trabajar con las siguientes condiciones: antígeno 1ug/mL, conjugado anti-IgG 1/2000 (las mismas condiciones para ambas proteínas recombinantes)

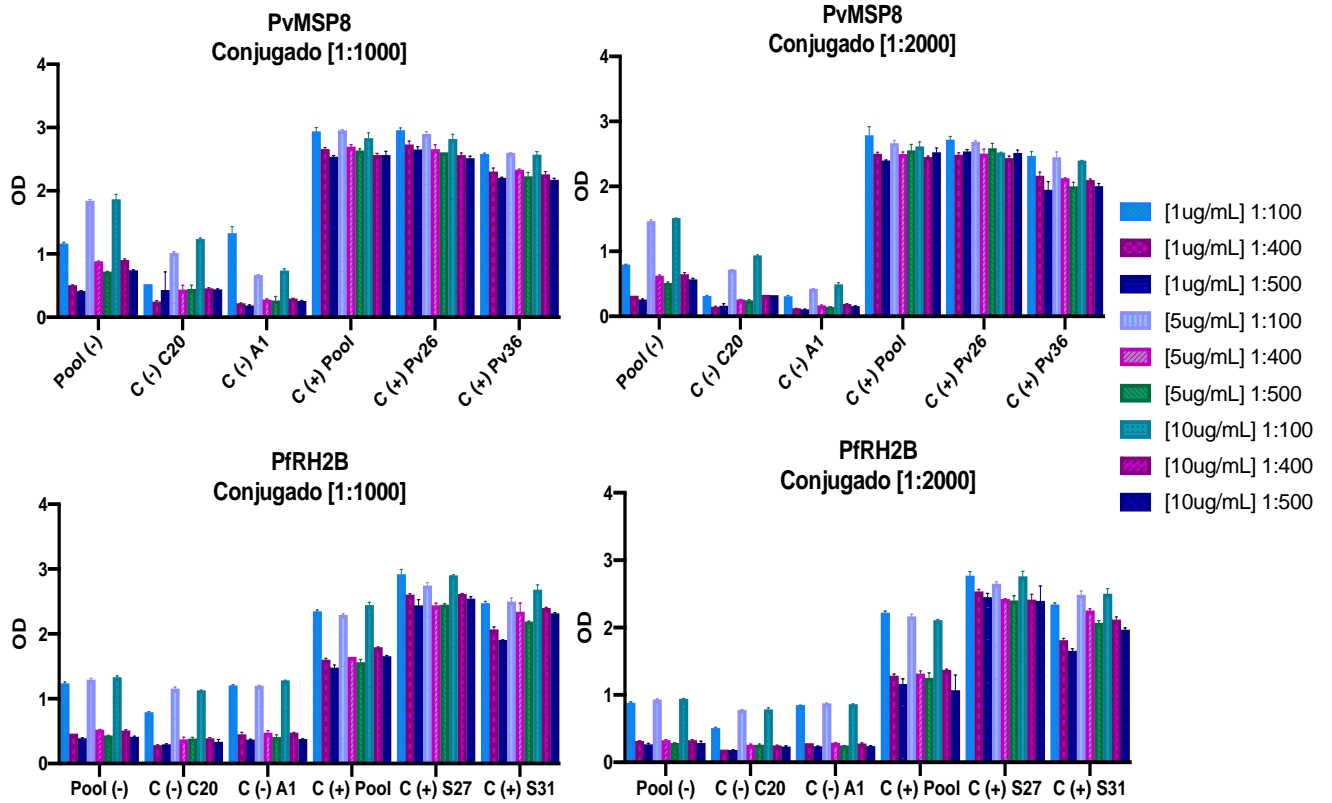


Figura N°08. Determinación de concentración de antígeno y conjugado para el ensayo de ELISA para rPvMSP8 y rPfrH2B. Se probaron tres concentraciones de antígeno: 1µg/mL, 5µg/mL y 10µg/mL; tres diluciones de sueros: 1/100, 1/400 y 1/500 y dos diluciones del conjugado Anti-IgG: 1/1000 y 1/2000 para ambas proteínas. Se trabajó con tres controles negativos (Pool (-), C20 y A1), tres controles positivos para infección por *P. vivax* (Pool (+), Pv26 y Pv36) y tres por *P. falciparum* (Pool (+), S27 y S31). Los OD se obtuvieron a 450nm.

En el caso de las proteínas PvMSP1, PvAMA1, PvMSP10, PfrMSP1 y PfrGLURP, se probaron diferentes concentraciones de antígenos y diluciones de sueros, con una sola dilución de conjugado anti-IgG (1/2000) (Fig. N°09). Se definió las siguientes condiciones; antígeno: 0.5µg/mL para PvMSP1, PvAMA1 y PfrGLURP y 1µg/mL para PfrMSP1 y PvMSP10.

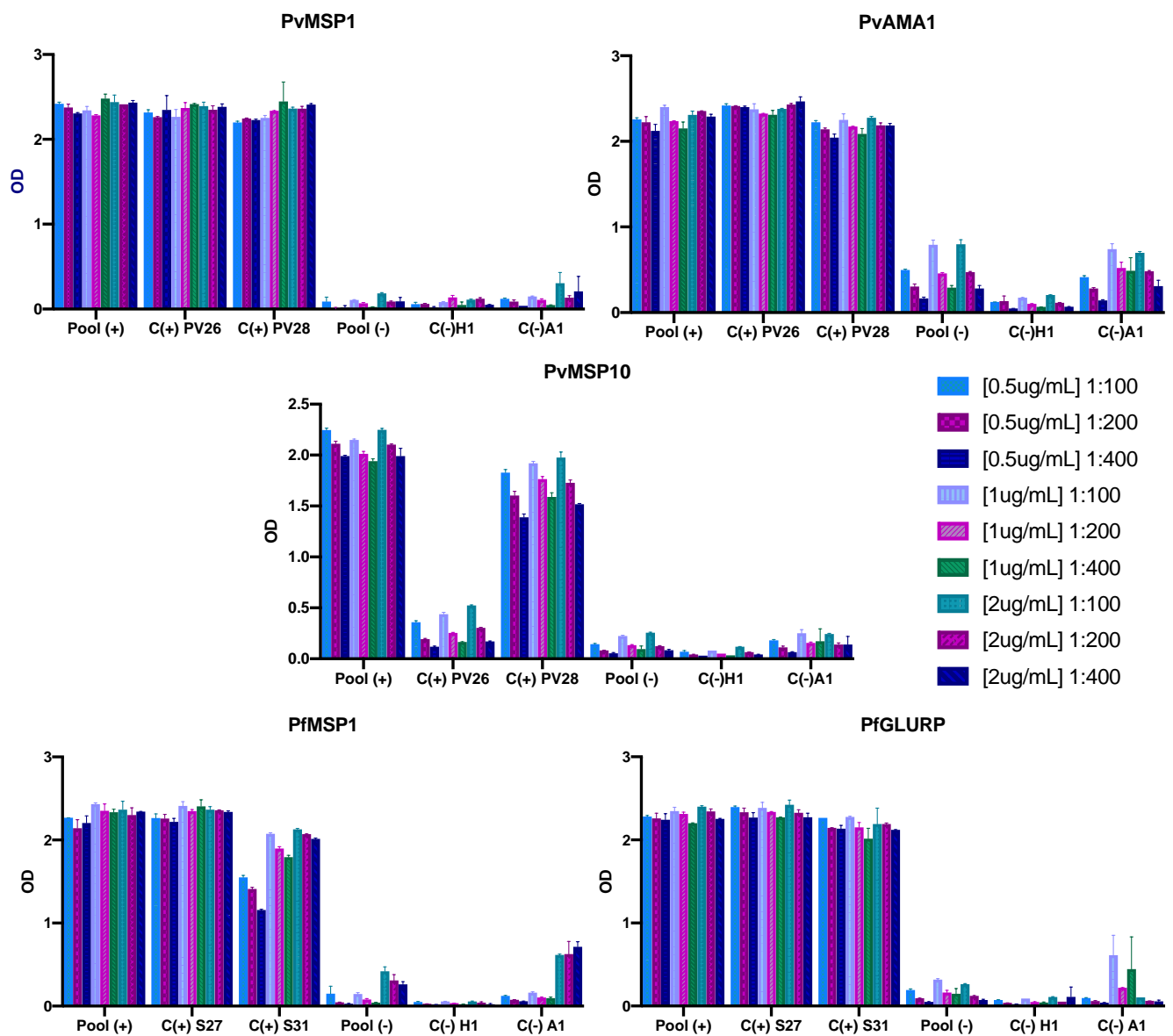


Figura N°09. Determinación de concentración de antígeno y conjugado para el ensayo de ELISA para PvMSP1, PvAMA1, PvMSP10, PfMSP1 y PfGLURP. Se probaron tres concentraciones de cada proteína: 0.5µg/mL, 1µg/mL y 2µg/mL y tres diluciones de sueros: 1/100, 1/200 y 1/400 para las cinco proteínas. Se trabajó con tres controles negativos (Pool (-), H1 y A1), tres controles positivos para infección por *P. vivax* (Pool (+)Pv26 y Pv28) y tres por *P. falciparum* (Pool (+), S27 y S31). Los OD se obtuvieron a 450nm.

Luego de determinar concentración de proteína a utilizar, se realizó una curva de diluciones seriadas con sueros positivos y negativos para determinar la concentración que se utilizará en los ensayos. Con estos resultados se determinó

que los sueros se trabajarían a una dilución de 1/400 pues los sueros positivos mantienen un OD alto y, además, se reduce el ruido de fondo en los controles negativos, tanto para las proteínas de *P. vivax* como para las de *P. falciparum* (Fig. 10 y 11).

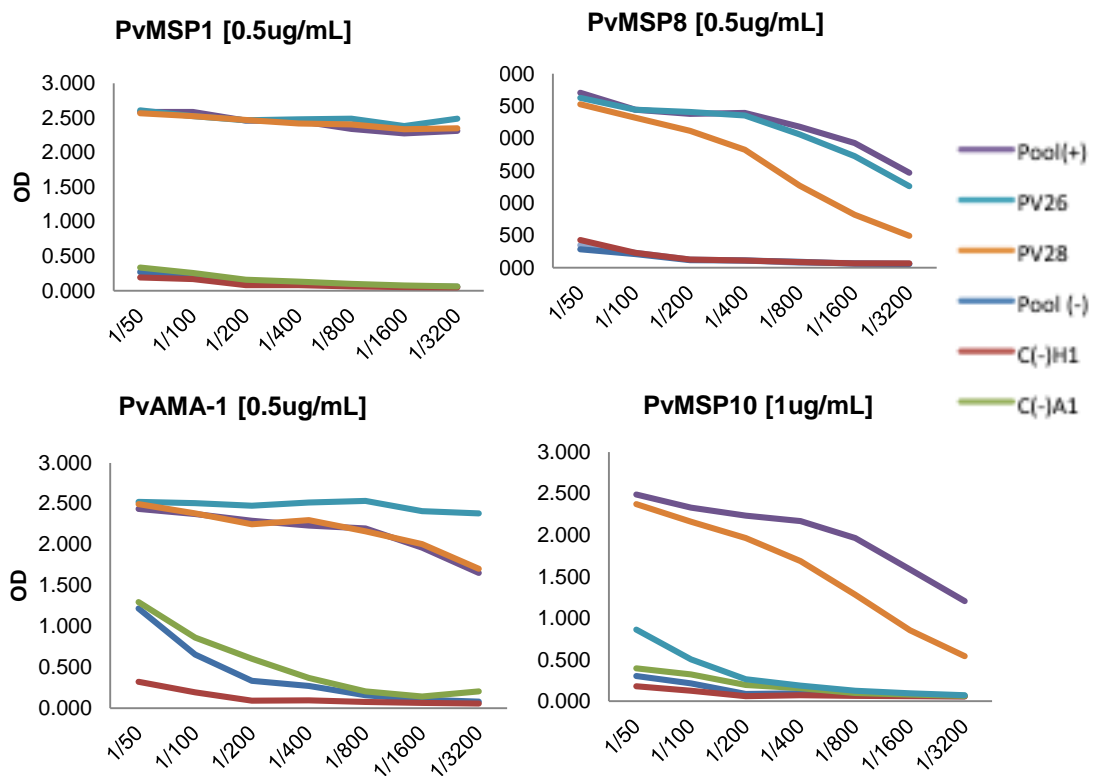


Figura N°10. Curva de diluciones de sueros negativos y positivos para infección por *P. vivax*. Se realizó una curva de diluciones seriadas de sueros controles negativos (*Pool(-)*, *C(-)H1* y *C(-)A1*) y controles positivos para infección a *P. vivax* (*Pool (+)*, *PV26* y *PV28*) con las proteínas *PvMSP1*, *PvAMA1*, *PvMSP8* y *PvMSP10*. La concentración de antígeno utilizada se muestra entre corchetes ([]). Los OD se obtuvieron a 450nm.

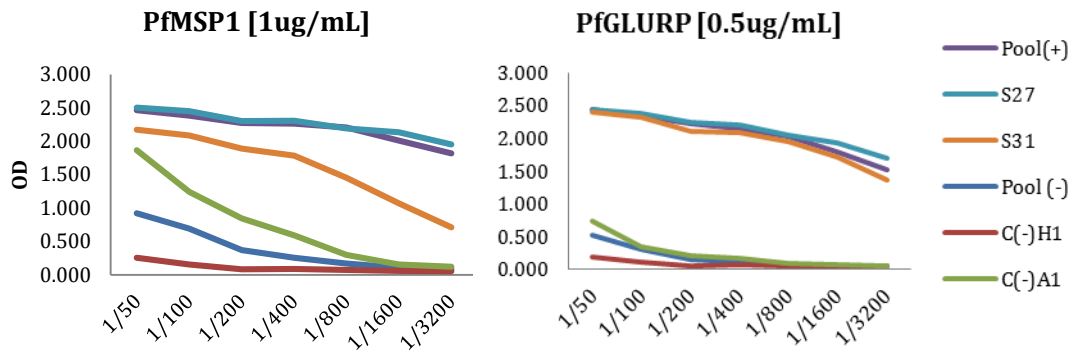


Figura N°11. Curva de diluciones de sueros negativos y positivos para infección por *P. falciparum*. Se realizó una curva de diluciones seriadas de sueros controles negativos (*Pool(-)*, *C(-)H1* y *C(-)A1*) y controles positivos para infección a *P. vivax* (*Pool (+)*, *S27* y *S31*) con las proteínas *PfMSP1* y *PfGLURP* . La concentración de antígeno utilizada se muestra entre corchetes ([]).

7.8 Reactividad de anticuerpos IgG contra las proteínas recombinantes mediante ensayos de ELISA

La sero-reactividad de anticuerpos IgG específicos contra las proteínas recombinantes se evaluó mediante ensayos de ELISA con sueros controles negativos y positivos para infección por *P. vivax* o *P. falciparum*.

Las proteínas recombinantes de *P. falciparum*, produjeron respuesta de IgG específica en 40 pacientes con infección activa por *P. falciparum* con un OD a 450nm promedio de 1.64, 1.91, 2.24 y 1.58 para *PfMSP1*, *PfGLURP*, *PfMSP10* y *PfRH2B* respectivamente. Así mismo para los antígenos de *P. vivax*, se obtuvieron OD a 450nm promedio de 1.73, 2.0, 1.32 y 1.93 para *PvMSP1*, *PvAMA1*, *PvMSP10* y *PvMSP8* respectivamente. Se observaron diferencias significativas cuando fueron comparados con los controles negativos para todas las proteínas evaluadas ($p < 0.00$) (Fig. 12).

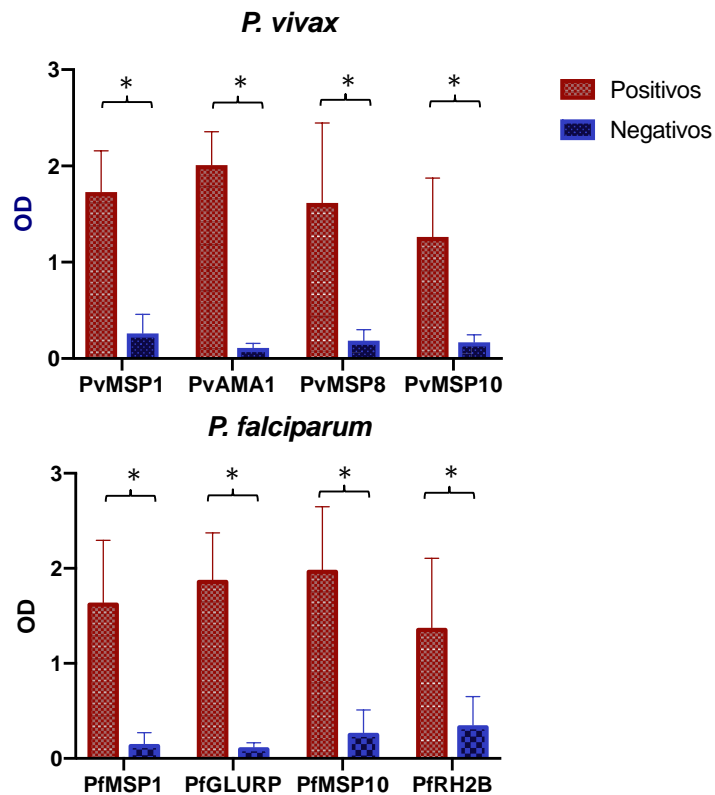


Figura N°12. Ensayo de ELISA, IgG específicos contra las proteínas recombinantes de *P. vivax* y *P. falciparum*. Se determinaron los niveles de IgG específicos contra las proteínas recombinantes de *P. vivax* (PvMSP1, PvAMA1, PvMSP8 y PvMSP10) y de *P. falciparum* (PfMSP1, PfGLURP, PfMSP10 y PfRH2B) en sueros de pacientes infectados por malaria, previamente con diagnóstico positivo por PCR a la infección por *P. vivax* (n=40) y *P. falciparum* (n=40) (barras rojas), e individuos sanos (n=40) (barras azules). OD determinado a 450nm *Mann-Whitney test $p < 0.05$.

7.9 Estandarización del ensayo de Luminex® multiplex para la evaluación de anticuerpos IgG específicos contra las proteínas recombinantes

En la estandarización del ensayo de Luminex® para evaluar la respuesta de IgG específica en sueros de pacientes contra las proteínas recombinantes se buscó determinar la cantidad óptima de proteína para ser utilizada en la unión covalente con las perlas magnéticas. De esta manera, la cantidad óptima para cada proteína se definió experimentalmente en función de la reactividad en una curva estándar hecha de un “pool” de 5 sueros positivos de pacientes con

infección activa por *P. vivax* y *P. falciparum*, buscando obtener una curva lineal.

En el caso de las proteínas de *P. vivax*, solo se logró obtener una curva estándar para PvMSP10 (0.25µg/1.25x10⁶ perlas), las otras tres proteínas, PvAMA1, PvMSP8 y PvMSP1, mostraron una respuesta IgG saturada (Fig. N°13A). Se debió seguir probando menores concentraciones de proteínas para conseguir curvas estándares para estas proteínas, pero por motivos de tiempo esto no se pudo lograr en esta tesis.

Por otra parte, se obtuvieron curvas para los cuatro antígenos recombinantes de *P. falciparum*, habiendo elegido las concentraciones: 0.125µg/1.25x10⁶ perlas para PfMSP1 y PfMSP10, 0.075µg/1.25x10⁶ perlas para PfrH2B y 0.01µg/1.25x10⁶ perlas para PfGLURP (Fig. 13B). Estas curvas se utilizarán para determinar la concentración relativa de anticuerpos en sueros de pacientes expuestos y no expuestos a *Plasmodium spp.* Debido a que no se pudo realizar la cuantificación relativa para todas las proteínas, los análisis se realizaron evaluando los MFI resultantes y la cuantificación relativa solo se muestra de manera descriptiva para las proteínas con las que se pudo realizar esta cuantificación.

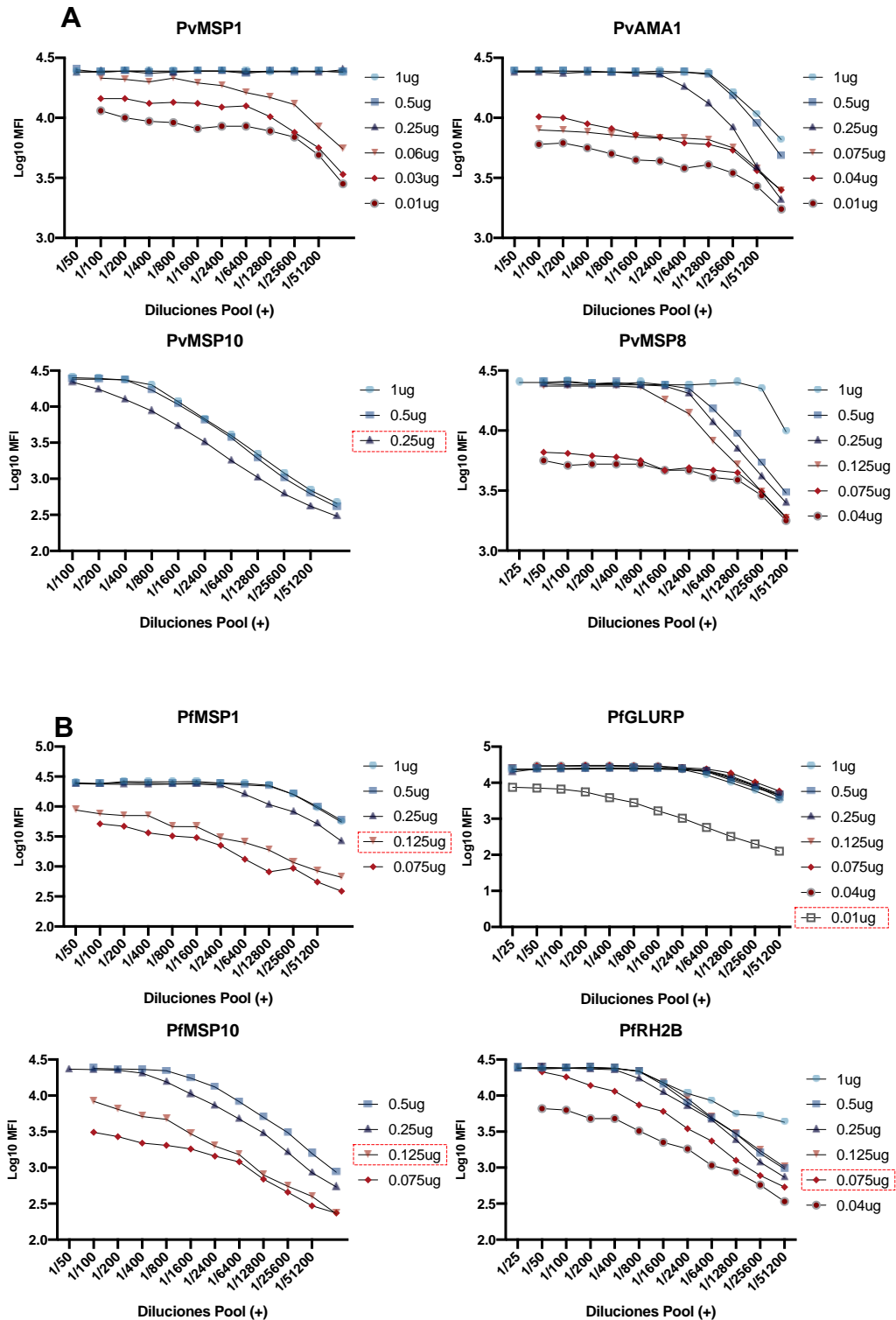


Figura N°13. Estandarización del ensayo de Luminex® para la evaluación de IgG específicos contra las proteínas recombinantes. Se evaluaron los niveles de IgG específicos contra las proteínas de *P. vivax* (A) y *P. falciparum* (B) en diluciones seriadas de un *pool* de 5 sueros de pacientes con diagnóstico positivo por PCR para infección por *P. vivax* y *P. falciparum*., Se utilizaron diferentes cantidades de proteínas unidas covalentemente a las perlas magnéticas. El recuadro rojo punteado señala la cantidad de proteína elegida como óptima para lograr una curva estándar. No se consiguió una curva estándar para las proteínas PvMSP1, PvAMA1 y PvMSP8 con las cantidades de proteínas evaluadas.

7.10 Evaluación de las proteínas recombinantes como marcadores serológicos utilizando Luminex® multiplex

7.10.1 Características Socio demográficas

Para definir el estado de exposición de los individuos se tomó en cuenta los resultados de PCR ya sea en el momento de la toma de muestra de suero o tomas de muestras previas (rango: 0-163 días). De esta manera, se definieron pacientes expuestos y no expuestos a *P. vivax* y *P. falciparum*.

Las comunidades de Cahuíde y Lupuna, presentaron una distribución homogénea según el grupo etario y el sexo. Cahuíde, con un total de 257 individuos enrolados, mostró una prevalencia de malaria en el momento de la toma de muestra, diagnosticada por PCR, para *P. vivax* de un 36.6% siendo estas infecciones en su mayoría asintomáticas (98.9%) y con una distribución sin diferencias significativas entre los grupos de edades y sexo. La prevalencia de *P. falciparum* para esta comunidad fue de un 6.6% y siendo en un 100% asintomática. Se observó una relación entre estado de infección por *P. falciparum* y el sexo de la población ($p = 0.06$) y que estuvo significativamente asociada al grupo etario ($p < 0.005$) (tabla N°05).

La comunidad de Lupuna, comprendida por un total de 164 individuos, presentó una prevalencia de *P. vivax* del 32.3% (98.1% de asintomáticos) y de 3.7% de *P. falciparum* (100% de asintomáticos). En esta comunidad solo se observó relación significativa entre el estado de infección por *P. vivax* y los grupos de edades ($p < 0.01$) (tabla N°05).

En ambas comunidades, la prevalencia definida por microscopía representa solo un 1.5% (36.6% por PCR) y 1.8% (32.3% por PCR) para las infecciones por *P. vivax* en Cahuíde y Lupuna, respectivamente. Con estos resultados se puede observar la gran diferencia entre la sensibilidad de diagnóstico molecular *versus* el realizado por microscopía, haciendo notar lo importante del desarrollo de métodos de estimación de individuos expuestos costo-eficientes.

Tabla N°05. Características de las poblaciones de estudio y su asociación con la infección por *Plasmodium spp.* evaluado por método de diagnóstico

Comunidad		<i>P. vivax</i> Expuestos [□]		<i>P. falciparum</i> Expuesto [□]		
		PCR	Microscopía	PCR	Microscopía	
CAHUÍDE	n = 257 (%)					
	Prevalencia	n= 94 (%) 36.6%	n= 4 (%) 1.5%	n= 17(%) 6.6%	n=0	
	Sexo					**
	Femenino	142 (55)	49 (52.1)	4 (100)	13 (76.5)	0
	Masculino	115 (45)	45 (47.9)	0	4 (23.5)	0
	Edad					***
	< 10	95 (37.2)	21 (22.3)	0	5 (29.4)	0
	11-29	83 (32.2)	32 (34)	3 (75)	4 (23.5)	0
	> 29	79 (30.6)	41 (43.6)	1 (25)	8 (47.1)	0
	Sintomáticos		1 (1.1)		0	
	Asintomáticos		93(98.9)		17 (100)	
LUPUNA	n= 164(%)					
	Prevalencia	PCR [□] n= 53 (%) 32.3%	Microscopía n= 3 (%) 1.8%	PCR [□] n= 6(%) 3.7%	Microscopía n=0	
	Sexo					
	Femenino	90 (54.9)	34 (64.2)	1 (33.3)	4 (66.7)	0
	Masculino	74 (45.1)	19 (35.9)	2 (66.7)	2 (33.3)	0
	Edad					*
	< 10	68 (41.5)	10 (18.9)	1 (33.3)	2 (33.3)	0
	11-29	56 (34.2)	22 (41.5)	2 (66.7)	2 (33.3)	0
	> 29	40 (24.4)	21 (39.6)	0	2 (33.3)	0
	Estatus clínico					
	Sintomáticos		1 (1.9)		0	
Asintomáticos		52 (98.1)		6 (100)		

[□]El estado de exposición se definió por todos los individuos con PCR positivo en cualquiera de las tomas de muestra previas o en el momento de la toma de suero (1-163 días).
p-value del T-test *p<0.01, **p=0.06, ***p<0.005

7.10.2 Determinación de la respuesta serológica IgG específica contra las proteínas recombinantes utilizando Luminex® multiplex

La evaluación de la respuesta serológica de tipo IgG específica se realizó mediante un ensayo multiplex de Luminex® obteniéndose valores de MFI para cada una de las ocho proteínas de manera independiente. En primer lugar, se buscó diferencias entre los niveles de anticuerpos en la población para cada antígeno entre ambas comunidades. Todos los antígenos de *P. falciparum* mostraron diferencias significativas entre las dos comunidades, siendo los niveles más altos en Lupuna, con valores de media de MFI para Cahuíde de 163.7 para PfMSP1, 273.5 para PfGLURP, 165.1 para PfMSP10 y 284.7 para PfrRH2B, y para Lupuna de 222.8 para PfMSP1, 586.6 para PfGLURP, 167.3 para PfMSP10 y 325.7 para PfrRH2B. Por otro lado, ninguno de los antígenos de *P. vivax* mostró diferencias entre ambas comunidades (Fig. 14).

En segundo lugar, se evaluaron los niveles de IgG específicos contra las diferentes proteínas entre pacientes expuestos y no expuestos. Al realizar este análisis se observó que para el caso de todos los antígenos de *P. vivax* se obtuvieron diferencias significativas entre los individuos expuestos y no expuestos, siendo esta respuesta para todas las proteínas mayor en los expuestos. Estos resultados se observaron en ambas comunidades (Fig. 15).

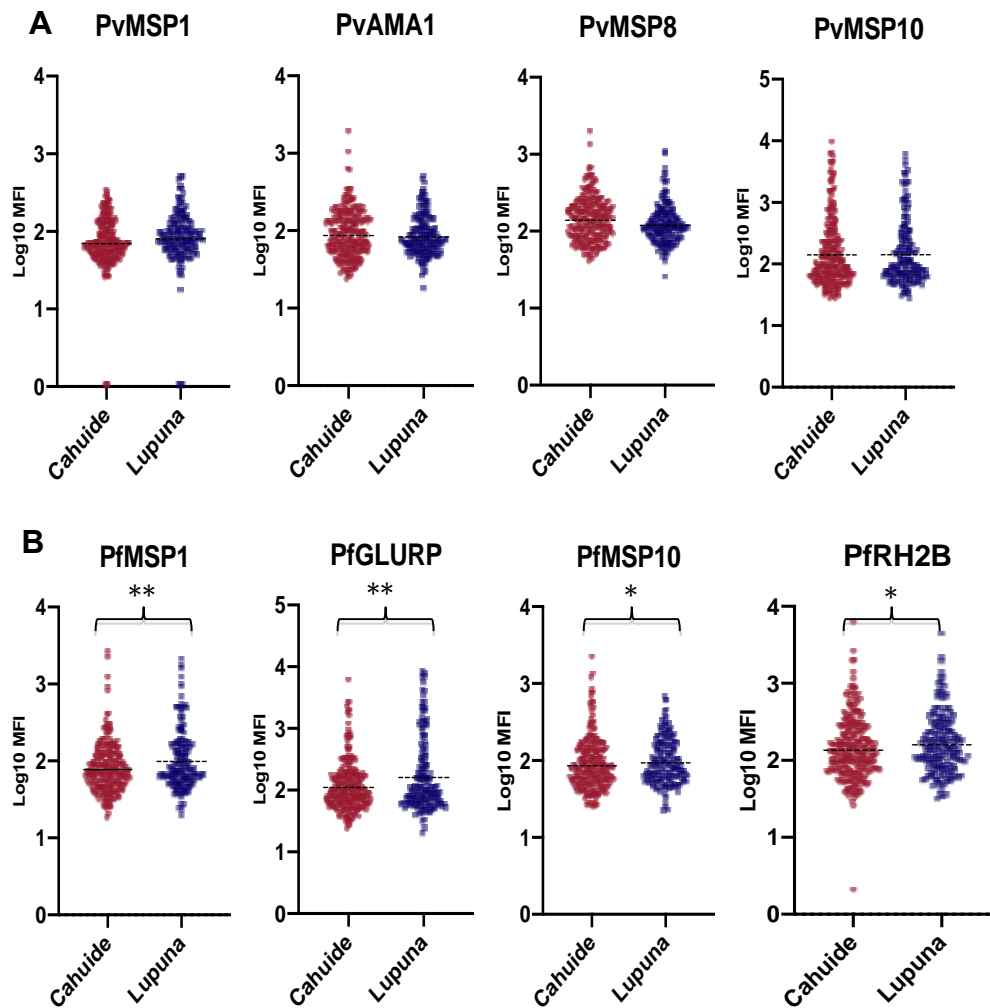


Figura N°14. Diferencias de los niveles de IgG específicos contra las proteínas recombinantes entre las comunidades de Cahuide y Lupuna. Se evaluaron los niveles de IgG específicos contra las proteínas de *P. vivax* (A) y *P. falciparum* (B) en sueros provenientes de una barrido poblacional en las comunidades de la Amazonía peruana, Cahuide (n=257) y Lupuna (n=164). La línea punteada indica la media de los MFI resultantes para cada población. T-test *p<0.05, **p<0.0005.

La comparación de los niveles de anticuerpos IgG entre expuestos y no expuestos para las proteínas de *P. falciparum* arrojó que solo existen diferencias significativas para los antígenos PfMSP1 y PfGLURP en la comunidad de Cahuide y PfMSP1, PfGLURP y PfMSP10 en la comunidad de Lupuna, siendo en todos estos casos, mayor en los individuos expuestos a *P. falciparum* (Fig. 16). Se debe tener en consideración que la incidencia de *P. falciparum* es baja en ambas comunidades (n=17 en Cahuide y n=6 en Lupuna), lo que podría estar afectando estos resultados.

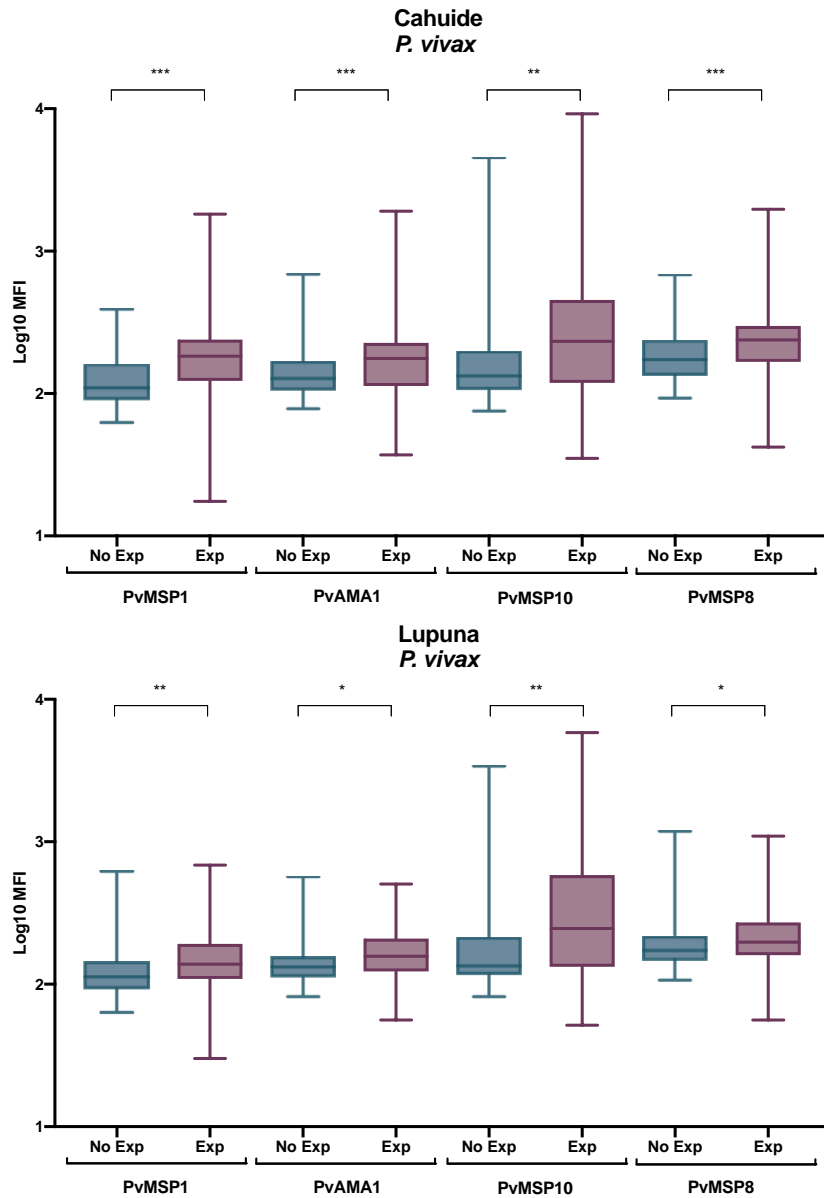


Figura N°15. Comparación de los niveles de anticuerpos IgG específicos contra las proteínas de *P. vivax* entre individuos expuestos y no expuestos en las comunidades de Cahuide y Lupuna. Los niveles de IgG específicos contra las proteínas de *P. vivax* fueron comparados entre los individuos no expuestos (No Exp) (Cahuide, n=163; Lupuna, n=111) y Expuestos (Exp) (Cahuide, n=94; Lupuna, n=53) a *P. vivax* en ambas comunidades. T-test $p < 0.05$ *, $p < 0.005$ ***, $p < 0.0001$ ***

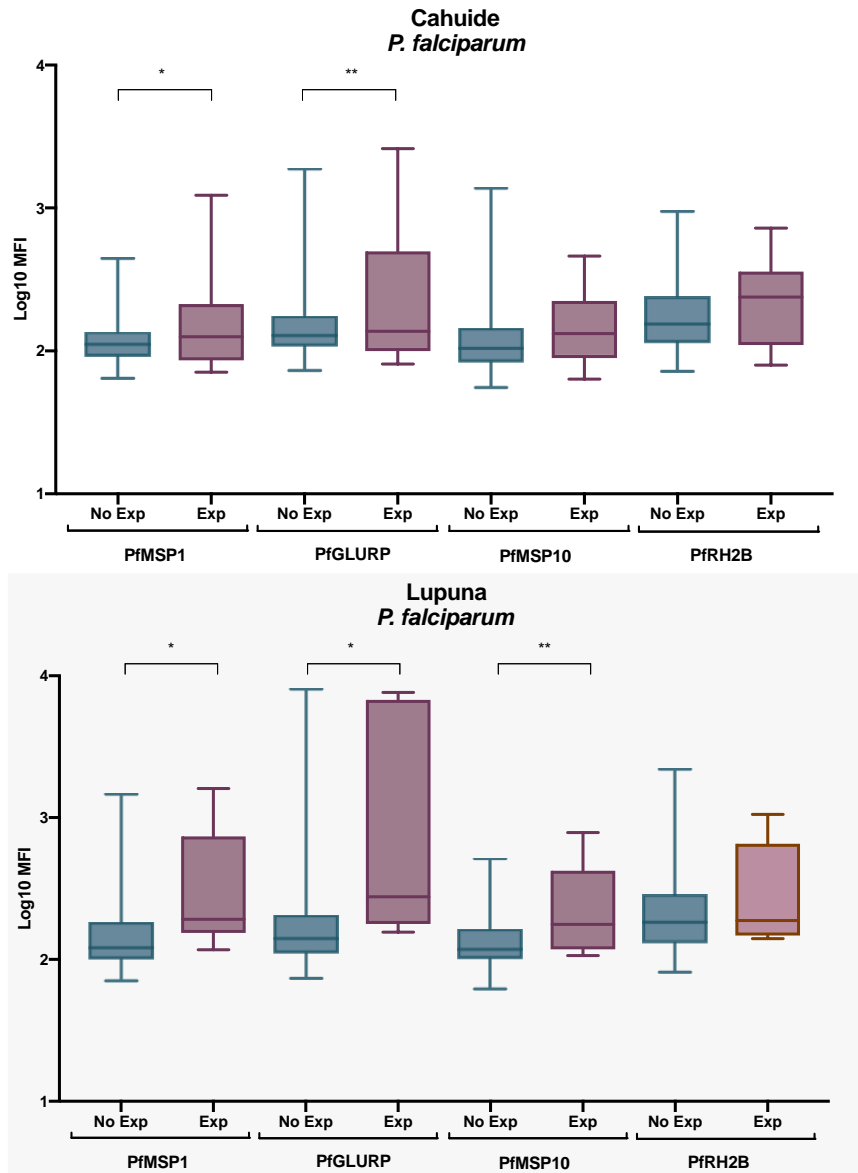


Figura N°16. Comparación de los niveles de anticuerpos IgG específica contra las proteínas de *P. falciparum* entre individuos expuestos y no expuestos en las comunidades de Cahuide y Lupuna . Los niveles de IgG específicos contra las proteínas de *P. falciparum* fueron comparados entre los individuos no expuestos (No Exp) (Cahuide, n=240; Lupuna, n=158) y Expuestos (Exp) (Cahuide, n=17; Lupuna, n=6) a *P. falciparum* en ambas comunidades. T-test $p < 0.05^*$, $p < 0.005^{**}$.

Es sabido que los títulos de anticuerpos IgG pueden verse afectados por la edad de los individuos. Para evaluar este efecto en la respuesta serológica hacia las proteínas evaluadas en este estudio, se realizó una comparación de los títulos de IgG entre los diferentes grupos etarios de la población según su estado de exposición (Fig. N°17

y N°18).

Los antígenos de *P. vivax* mostraron todas diferencias significativas entre los grupos etarios ya sea en los individuos expuestos como no expuestos para ambas comunidades. Al evaluar las diferencias entre cada grupo en función de su estado de exposición, se encontraron diferencias significativas entre los individuos de 11 a 29 años expuestos y no expuestos con las proteínas recombinantes PvMSP1, PvAMA1, PvMSP8 en la comunidad de Cahuide y PvMSP1 en Lupuna (Fig. N°17).

Así mismo, los títulos de las cuatro proteínas de *P. falciparum* mostraron diferencias entre los grupos de edades en los individuos no expuestos en las dos comunidades. Sin embargo, para el caso de los individuos expuestos, solo se vieron diferencias entre los grupos de edades para PfRH2B en la comunidad de Cahuide y PfMSP1, PfGLURP, PfRH2B en Lupuna. Además, solo se vieron diferencias significativas entre los individuos mayores a 30 años entre expuestos en la comunidad de Lupuna para PfMSP1, PfGLURP y PfMSP10. Debido a que solo se registraron dos pacientes expuestos a *P. falciparum* en cada uno de los grupos de edad, esto podría estar afectando estos resultados. Otro punto a resaltar es que todos los antígenos, tanto de *P. vivax* como de *P. falciparum*, mostraron un aumento de los títulos proporcional a la edad en expuestos y no expuestos (Fig. N°17 y N°18)

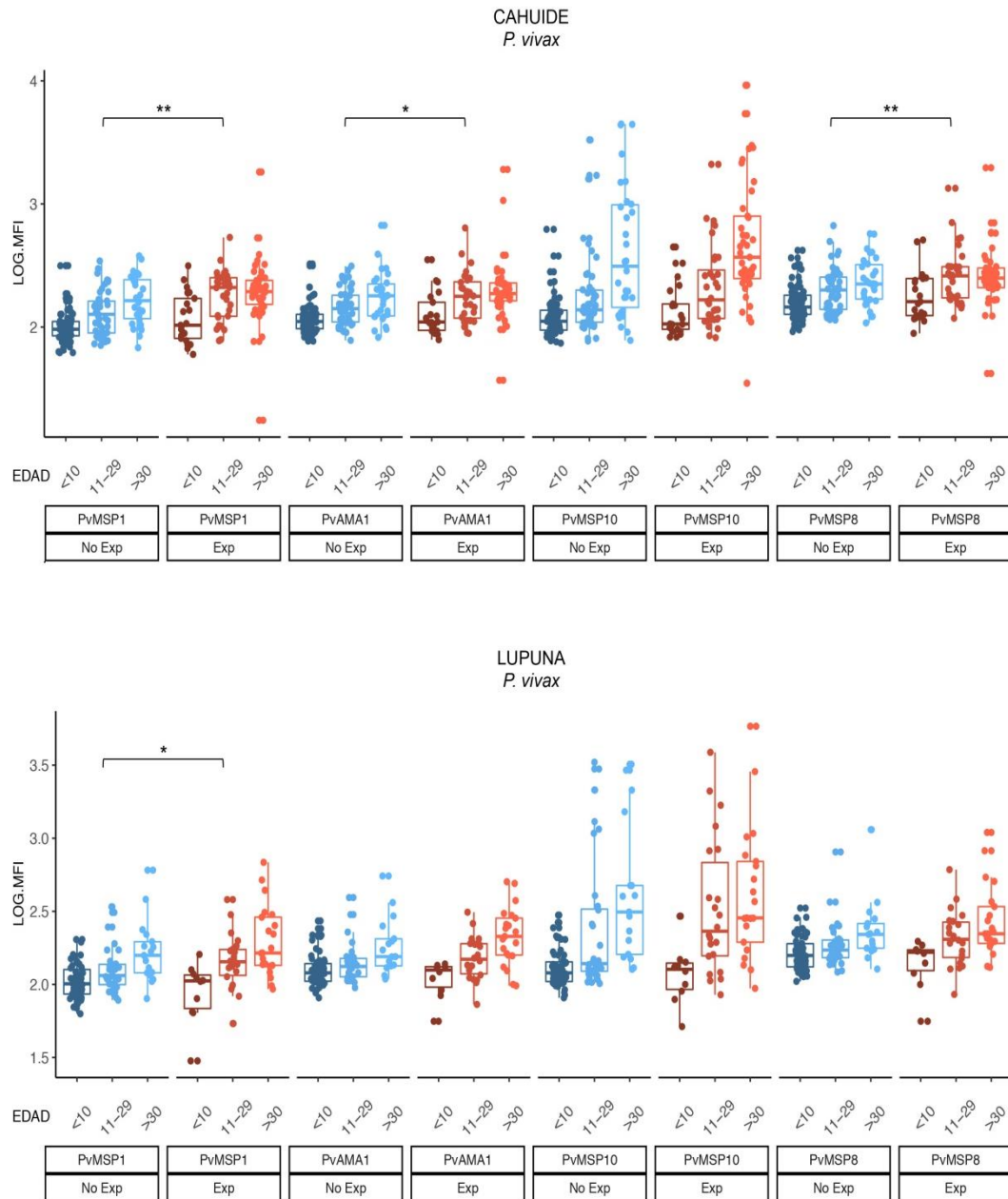


Figura N°17. Comparación de los niveles de anticuerpos IgG específica contra las proteínas de *P. vivax* entre los grupos etarios en las comunidades de Cahuide y Lupuna. Los niveles de IgG específicos contra las proteínas de *P. vivax* fueron evaluados en un ensayo de Luminex® multiplex. Expuestos a *P. vivax* (Exp), No expuestos a *P. vivax* (No Exp). Se muestran los valores de p-value del test de Wilconxon $p < 0.05^*$, $p < 0.005^{**}$

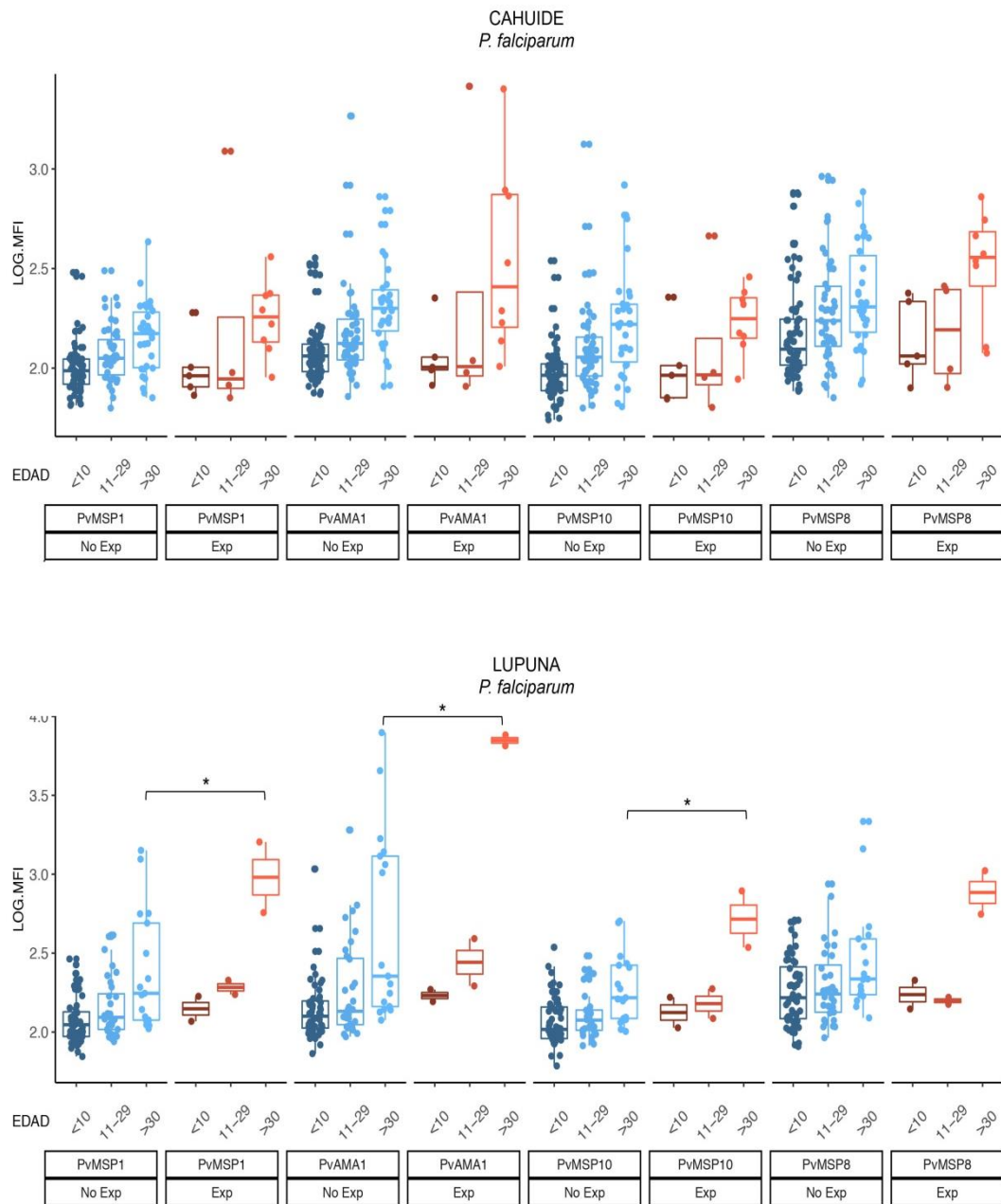


Figura N°18. Comparación de los niveles de anticuerpos IgG específica contra las proteínas de *P. falciparum* entre los grupos etarios en las comunidades de Cahuide y Lupuna. Los niveles de IgG específicos contra las proteínas de *P. falciparum* fueron evaluados en un ensayo de Luminex multiplex. Expuestos a *P. falciparum* (Exp), No expuestos a *P. falciparum* (No Exp). Se muestran los valores de p-value del test de Wilconxon $p < 0.05^*$, $p < 0.005^{**}$

Por último, se realizó un análisis de regresión multivariado para los títulos de anticuerpos de cada antígeno ajustados por las variables de exposición, sexo, edad e historial de infección (tablas 6 y 7). Esta última determinada por la cantidad de infecciones por *Plasmodium spp.* durante la vida reportada por cada paciente. Los resultados para este análisis fueron los siguientes:

- * PvMSP1: Un mayor nivel de anticuerpos contra el antígeno PvMSP1 se vio asociado estar expuesto, ser hombre, tener más de 11 años y haber tenido más de una infección en su vida en la comunidad de Cahuíde. Similarmente, tener más de 11 años y haber tenido más de 5 infecciones, fueron las variables asociadas a un mayor título de anticuerpos en Lupuna.
- * PvAMA1: En Cahuíde, el mayor nivel de anticuerpos se vio asociado con ser hombre, tener más de 11 años y haber tenido más de una infección en su vida. En Lupuna, los niveles más altos de IgG solo se vieron asociados a tener más de 11 años y haber tenido más de cinco infecciones.
- * PvMSP8: Estar expuesto, ser hombre, tener más de 11 años y haber tenido entre 1 y 4 infecciones en su vida, estuvieron a asociados a un mayor nivel de anticuerpos en Cahuíde. En Lupuna, solo se vio asociación con tener más de 11 años.
- * PvMSP10: Tener más de 1 infección estuvo a asociado a un título alto de anticuerpos en Cahuíde y tener más de 11 años tanto en Cahuíde como en Lupuna. Además, el tener un nivel de anticuerpos mayor estuvo asociado a residir en Cahuíde.

- * PfMSP1: Ser hombre, ser mayor de 11 años y haber tenido entre una y tres infecciones en su vida, estuvieron asociados a un título más alto de anticuerpos en Cahuíde. Estar expuesto y tener más de 11 años, fueron las variables asociadas a un mayor título de IgG en Lupuna. Además, residir en Lupuna presentó asociación a tener títulos altos en referencia a Cahuíde.
- * PfGLURP: Vivir en Lupuna fue un factor asociado a tener títulos altos de anticuerpos. En Cahuíde, las variables asociadas fueron ser hombre y tener más de 11 años. En Lupuna, esta asociación se vio con estar expuesto y tener mas de 11 años.
- * PfMSP10: Tener más de 11 años estuvo asociado a un mayor título de IgG en ambas comunidades. Además, estar expuesto estuvo asociado al nivel de IgG en Lupuna.
- * PfRH2B: Los residentes de Lupuna tuvieron mayor nivel de anticuerpos y los niveles de IgG estuvieron asociados a tener más de 11 años en ambas comunidades.

Tabla N° 06. Análisis de regresión multivariada para los niveles de anticuerpos IgG para los antígenos de *P. vivax*.

Comunidad	PvMSP1			PvAMA1			PvMSP8			PvMSP10		
	Coef.	IC 95%	<i>P</i> -value	Coef.	IC 95%	<i>p</i> -value	Coef.	IC 95%	<i>P</i> -value	Coef.	IC 95%	<i>P</i> -value
CAHUIDECAHUÍDE	Ref.											
Expuestos	Ref.											
No	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
Si	0.0739	(0.02 - 0.128)	0.008 *	0.048	(-0.002-0.099)	0.06	0.056	(0.002-0.111)	0.044 *	0.008	(-0.092-0.108)	0.88
Sexo	Ref.											
Masculino	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
Femenino	-0.048	(-0.09 -0.002)	0.05 *	-0.05	(-0.093 -0.002)	0.04 *	-0.05	(-0.101- -0.004)	0.035 *	-0.08	(-0.165-0.0108)	0.085
Edad	Ref.											
< 10	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
11-29	0.111	(0.06-0.163)	0.000 ***	0.09	(0.044-0.136)	0.000 ***	0.105	(0.05-0.16)	0.000 ***	0.121	(0.031-0.210)	0.008 *
> 29	0.175	(0.114-0.237)	0.000 ***	0.154	(0.09-0.215)	0.000 ***	0.142	(0.079-0.204)	0.000 ***	0.425	(0.296-0.555)	0.000 ***
Historial de Infección⁺	Ref.											
0	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
1-4	0.101	(0.054-0.148)	0.000 ***	0.061	(0.018-0.103)	0.005 **	0.071	(0.022-0.119)	0.005 **	0.159	(0.069-0.25)	0.001 ***
5-7	0.173	(0.068-0.279)	0.000 ***	0.117	(0.041-0.192)	0.002 **	0.091	(-0.017-0.199)	0.098	0.476	(0.111-0.841)	0.011 *
> 7	-0.026	(-0.16-0.108)	0.699	0.053	(-0.106-0.212)	0.51	-0.07	(-0.195-0.049)	0.245	0.717	(0.185-1.248)	0.008 **
LUPUNA	0.005	(-0.03-0.042)	0.798	0.02	(-0.012-0.052)	0.215	-0.01	(-0.042-0.032)	0.801	0.079	(0.01-0.148)	0.026 *
Expuestos	Ref.											
No	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
Si	-0.00015	(-0.07-0.073)	0.997	-0.01	(-0.063-0.054)	0.886	-0.02	(-0.071-0.067)	0.955	0.021	(-0.137-.179)	0.794
Sexo	Ref.											
Masculino	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
Femenino	-0.011	(-0.07-0.043)	0.696	-0.02	(-0.068-0.026)	0.38	-0.03	(-0.083-0.026)	0.303	-0.05	(-0.163-.071)	0.435
Edad	Ref.											
< 10	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
11-29	0.089	(0.025-0.15)	0.006 *	0.059	(0.008-0.110)	0.023 *	0.073	(0.015-0.131)	0.014 *	0.303	(0.166-0.439)	0.000 ***
> 29	0.228	(0.139-0.32)	0.000 ***	0.197	(0.122-0.272)	0.000 ***	0.189	(0.102-0.276)	0.000 ***	0.473	(0.301-0.645)	0.000 ***
Historial de Infección⁺	Ref.											
0	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
1-4	0.0490192	(-0.03-0.127)	0.214	0.033	(-0.031-0.098)	0.308	0.035	(-0.04-0.111)	0.359	0.066	(-0.104-0.236)	0.443
5-7	0.147933	(0.05-0.245)	0.003 ***	0.135	(0.048-0.223)	0.003 **	0.134	(-0.008-0.275)	0.063	0.139	(-0.102-0.382)	0.26
> 7	-			-			-			-		

⁺El historial de infección se definió como todas las infecciones pasadas reportadas por los pacientes

p*<0.05, *p*<0.005, ****p*<0.001

Tabla N°07. Análisis de regresión multivariada para los niveles de anticuerpos IgG para los antígenos de *P. falciparum*.

Comunidad	PfMSP1			PfGLURP			PfMSP10			PfRH2B		
	Coef.	IC 95%	<i>p</i> -value	Coef.	IC 95%	<i>p</i> -value	Coef.	IC 95%	<i>p</i> -value	Coef.	IC 95%	<i>p</i> -value
CAHUÍDE	Ref.											
Expuestos	Ref.											
No	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
Si	0.054	(-0.088-0.195)	0.455	0.113	(-0.098-0.323)	0.292	0.011	(0.098-0.119)	0.848	0.01	(-0.107-0.128)	0.864
Sexo	Ref.											
Masculino	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
Femenino	-0.07	(-0.126 - -0.013)	0.017 *	-0.10	(-0.178 --0.028)	0.007 *	-0.04	(-0.096-0.021)	0.211	-0.06	(-0.13-0.014)	0.115
Edad	Ref.											
< 10	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
11-29	0.096	(0.041-0.151)	0.001 ***	0.106	(0.0342-0.178)	0.004 **	0.133	(0.071-0.195)	0.000 ***	0.118	(0.042-0.195)	0.003 **
> 29	0.163	(0.085-0.241)	0.000 ***	0.282	(0.176-0.388)	0.000 ***	0.228	(0.15-0.305)	0.000 ***	0.228	(0.129-0.327)	0.000 ***
Historial de Infección⁺	Ref.											
0	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
1-3	0.138	(0.027-0.248)	0.015 *	0.033	(-0.098-0.164)	0.62	0.116	(-0.005-0.236)	0.061	0.111	(-0.031-0.253)	0.125
> 4	-0.04	(-0.212-0.132)	0.646	0.32	(-0.375-1.014)	0.62	0.252	(-0.162-0.666)	0.232	0.213	(-0.217-0.644)	0.33
LUPUNA	0.11	(0.063-0.157)	0.000 ***	0.165	(0.094-0.237)	0.000 ***	0.043	(-0.049-0.134)	0.363	0.069	(.0123019 .126)	0.017 *
Expuestos	Ref.											
No	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
Si	0.223	(0.041-0.404)	0.017 *	0.393	(0.06-0.727)	0.021 *	0.153	(0.001-0.305)	0.049 *	0.039	(-0.121-0.199)	0.63
Sexo	Ref.											
Masculino	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
Femenino	0.026	(-0.048-0.1)	0.488	-0.01	(-0.126-0.108)	0.878	-0.01	(-0.069-0.049)	0.742	-0.03	(-0.119-.065)	0.561
Edad	Ref.											
< 10	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
11-29	0.117	(0.05-0.185)	0.001 ***	0.219	(0.099-0.338)	0.000 ***	0.08	(0.019-0.14)	0.01 *	0.103	(0.013-0.194)	0.025 *
> 29	0.401	(0.253-0.55)	0.000 ***	0.603	(0.392-0.815)	0.000 ***	0.266	(0.164-0.367)	0.000 ***	0.278	(0.119-0.437)	0.001 ***
Historial de Infección⁺	Ref.											
0	Ref.			Ref.			Ref.			Ref.		
1-3	0.058	(-0.113-0.229)	0.506	0.178	(-0.07-0.425)	0.159	0.055	(-0.071-0.181)	0.391	0.127	(-0.09-0.345)	0.249
> 4	0.114	(-0.262-0.489)	0.551	0.472	(-0.235-1.18)	0.189	0.072	(-0.181-0.326)	0.574	0.156	(-0.246-0.558)	0.444

⁺El historial de infección se definió como todas las infecciones pasadas reportadas por los pacientes

p*<0.05, *p*<0.005, ****p*<0.001

7.10.3 Cuantificación relativa de anticuerpos IgG contra las proteínas recombinantes

La cuantificación relativa de los anticuerpos para cada uno de los antígenos se realizó mediante una curva estándar en cada placa corrida. En la tabla N°08 se pueden observar las unidades relativas de anticuerpos para cada uno de los antígenos con los que se pudo determinar dicha curva.

Tabla N° 08. Cuantificación relativa de anticuerpos IgG específicos contra las proteínas recombinantes

	CAHUÍDE				LUPUNA			
	EXP		NO EXP.		EXP		NO EXP.	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
PvMSP10	9.00E-04	3.40E-03	8.00E-04	4.00E-03	7.00E-04	3.10E-03	1.00E-03	3.90E-03
PfMSP1	1.00E-04	7.00E-04	1.00E-04	3.00E-04	2.00E-04	6.00E-04	5.00E-04	9.00E-04
PfGLURP	1.00E-04	2.00E-04	0.00E+00	3.00E-04	6.70E-03	1.03E-02	4.00E-04	2.30E-03
PfMSP10	2.00E-04	8.00E-04	2.00E-04	2.00E-04	4.00E-04	2.00E-04	2.00E-04	5.00E-04
PfRH2B	1.00E-04	9.00E-04	2.00E-04	1.00E-04	2.00E-04	5.00E-04	2.00E-04	2.00E-04

Los valores se expresan en unidades arbitrarias de unidades relativas de anticuerpos.

Los valores fueron calculados en base a una curva estándar usando el modelo de regresión logístico 5PL.

8. DISCUSIÓN

8.1 Producción de proteínas recombinantes en un sistema de expresión de Baculovirus

Para la elección del sistema expresión de proteínas recombinantes se debe considerar las características intrínsecas de la proteína. La expresión de proteínas recombinantes de *Plasmodium spp*, específicamente proteínas involucradas en la unión e invasión del parásito al eritrocito para las cuales su conformación es crítica, ha sido reportada exitosamente en diversos sistemas como son *E.coli* (Pan *et al.*, 1990; Black *et al.*, 2003; Giraldo *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2003), sistema libre de células (Cheng *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2010), células de mamífero (Hostetler *et al.*, 2015, Carrasco *et al.*, 2017) y Baculovirus (Victor *et al.*, 2010; Perraut *et al.*, 2014, Perraut *et al.*, 2017; Pizarro *et al.*, 2003; Joos *et al.*, 2015), entre otros. Por lo tanto, los datos existentes no indican que un sistema de expresión heterólogo sea definitivamente superior al otro y aunque las herramientas bioinformáticas pueden ayudar a esta predicción, esta aproximación no es del todo certera y la identificación del sistema óptimo para la expresión sigue siendo una cuestión de prueba experimental.

La expresión mediada por Baculovirus en células de insecto es, en la actualidad, una metodología bien establecida para la producción de proteínas recombinantes de alto peso molecular. Su uso frecuente se debe a la relativa facilidad y velocidad con que se puede expresar una proteína con activa biológica funcional (Jarvis, 2009). En este estudio se logró la expresión de dos

proteínas recombinantes, MSP8 (51 KDa) de *P. vivax* y RH2B (250 KDa) de *P. falciparum*, mediante el sistema de expresión de Baculovirus y fueron reconocidas por anticuerpos IgG específicos en sueros, presentando una respuesta diferencial entre controles positivos con infección por *Plasmodium spp.* y controles sanos mediante ensayos de ELISA. Para poder tener una mejor comprensión sobre la conformación correcta de las proteínas sintetizadas se deberá realizar estudios adicionales como por ejemplo cristalografía.

Una de las ventajas de este sistema es la posibilidad de la implementación de producción a gran escala. Estudios anteriores han reportado la producción de proteínas de *Plasmodium spp.* como MSP1, de hasta de 0.85mg/5.5L y 1mg/L (Blackman *et al.*, 1993) y 0.9mg/500mL (Mehlin *et al.*, 2006). En este estudio la producción lograda fue de 428µg/mL para PvMSP8 y 8mg/mL para PfRH2B en un volumen de cultivo de células Sf9 de solo 170mL, demostrado una muy buena eficiencia de producción. Sin embargo, para determinar hasta qué cantidades por litro de cultivo se podría llegar a producir en nuestro laboratorio, se necesitarían mayores estudios.

La selección de proteínas para los ensayos de sero-vigilancia estará influenciada por sus propiedades, incluida inmunogenicidad, longevidad de los anticuerpos y polimorfismo. En un primer paso la selección de las secuencias de los genes utilizados para la expresión de las proteínas recombinantes, se buscó determinar el grado de polimorfismos de las secuencias depositadas en las bases de datos de NIH y PlasmoDB. Este análisis arrojó que tanto las proteínas PvMSP8 como

PfRH2B, no tuvieron mayores polimorfismos dentro de las secuencias evaluadas. Sin embargo, al realizar un PCR con primers específicos para las secuencias seleccionadas con ADN de muestras provenientes de la Amazonia peruana, el gen *pfrh2b* mostró un polimorfismo de longitud de aproximadamente 200pb. Para determinar si existe polimorfismo para el gen de *pfrh2b* sería necesario realizar análisis genómico con

8.2 Evaluación de proteínas recombinantes como marcadores de seroprevalencia

El uso de seromarcadores como herramienta para la medición de prevalencia y transmisión de malaria ha probado ser una aproximación eficaz en poblaciones con baja transmisión, en donde una de las características de la infección por *Plasmodium spp.* es la gran proporción de pacientes que no pueden ser diagnosticados por microscopía, debido al bajo número de parásitos en sangre, a estos pacientes se les conoce como subpatentes (Steward *et al.*, 2009, Sepúlveda *et al.*, 2015). Así, métodos de diagnóstico de infección activa, pueden carecer de sensibilidad para estimar la real proporción de individuos expuesto, mientras que pruebas más sensibles, como el diagnóstico molecular por PCR, tienen costos elevados y requieren de equipos costosos y muy difíciles de implementar en comunidades rurales (Rosas *et al.*, 2015). Esto se pudo observar con nuestros resultados, donde por microscopía sólo se llegó a estimar un 5.7% de los casos estimados por PCR de infección por *P. vivax* en Cahuíde y un 4.3% en Lupuna, mientras que no se logró diagnosticar ninguna de las infecciones por *P. falciparum* por este método. Con esto, se evidencia la importancia de contar

con herramientas adecuadas a nuestro contexto de transmisión que ayuden a evaluar de manera costo/efectividad el impacto de las intervenciones de control, particularmente cuando la intensidad de la transmisión ya es baja. Más aún, debido a que hasta las técnicas de diagnóstico más sensible no detectarían a un paciente con infecciones subpatentes o que acaba de eliminar la infección, la utilización de seromarcadores nos proporcionaría una mejor visión del contexto de transmisión.

Existen marcadores serológicos ampliamente utilizados a nivel mundial y también en la Amazonía, como son las proteínas MSP1, AMA1 y GLURP (Sepúlveda *et al.*, 2015). El antígeno MSP1, es una de las proteínas más estudiadas de *Plasmodium spp.* como candidato a vacuna debido a su asociación con protección clínica en pacientes (Riccio *et al.*, 2013; Jäschke *et al.*, 2017; Torres *et al.*, 2008). Además, estudios utilizando PvMSP1 en conjunto con PvAMA1 y PfGLURP como seromarcadores en la Amazonía peruana, demostraron asociación entre la exposición a malaria y la edad de los pacientes, sirviendo para la identificación de “hotspot” de transmisión en conjunto con un análisis espacial (Rosas *et al.*, 2015). Similarmente, nuestros resultados mostraron que los niveles de los títulos de IgG contra ambas proteínas, MSP1 y AMA1 de *P. vivax* estuvieron asociadas con infecciones previas, la edad y sexo de los pacientes en las dos localidades, mientras que PfGLURP estuvo asociada sólo a sexo y edad en Cahuíde y al estado de exposición y la edad en Lupuna.. De esta manera, nuestros resultados con estos antígenos mediante un método de Luminex® multiplex, nunca antes utilizado en la Amazonía peruana para este

tipo de estudios, concuerdan con lo reportado (Yildiz *et al.*, 2011; Cutts *et al.*, 2014). Asimismo, nos demuestran que esta podría ser una aproximación costo/efectividad para el estudio de potenciales seromarcadores en una plataforma multiplex, la cual hace posible probar de manera simultánea más de 100 proteínas arrojando resultados individuales, ahorrando tiempo, muestras y reactivos. Además de estas ventajas, los costos se reducen considerablemente una vez estandarizada, por lo que sería posible realizar tamizajes a nivel poblacional para determinar la exposición.

Nuestro grupo de investigación, en dos estudios previos utilizando microarreglos de proteínas, identificó proteínas de *Plasmodium spp.* capaces de inducir una respuesta diferencial entre pacientes con infección activa y controles sanos: cuatro proteínas, PvMSP8, PvMSP10, PfMSP10 y PfRH2B, demostraron ser capaces de inducir títulos altos de anticuerpos específicos en pacientes sintomáticos y asintomáticos de la Amazonia peruana (Chuquiyauri *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2014). Por esta razón, este estudio se enfocó en evaluar estas proteínas como potenciales marcadores de seroprevalencia.

En un estudio previo, Carrasco *et al.* utilizó PvMSP10 y PfMSP10, expresados en un sistema en células de mamíferos, para cuantificar la tasa de portadores subpatentes en las comunidades de Cahuíde y Lupuna, e identificar su relación con patrones de transmisión de *P. vivax* y *P. falciparum*. Se encontró que los individuos mayores a 30 años seropositivos al antígeno PvMSP10 mediante ELISA, mostraron una asociación significativamente mayor a estar expuestos a

P. vivax. Por otro lado, la infección por *P. falciparum* estuvo asociada a los individuos seropositivos a PfMSP10 con edades entre 10 y 29 e historial previo de infección. Similarmente, nuestros resultados mostraron una asociación entre el título de anticuerpos contra PvMSP10 con la edad (mayores a 11 años) para ambas comunidades y haber tenido más de 1 infección solo en la comunidad de Cahuilde. Al ser Cahuilde una comunidad donde la transmisión es más baja, la memoria humoral podría ser dependiente del número de infecciones que padecen los individuos debido a la capacidad del sistema inmune a recordar antígenos o patógenos previamente reconocidos, lo que hace posible generar una respuesta reforzada para controlar la infección (Ly y Hansen, 2019). Sin embargo, la respuesta IgG contra los antígenos de *P. falciparum*, PfRH2B y PfMSP10, solo se vieron asociados a un contexto más alto de transmisión (Lupuna) y a la edad. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el número de casos de *P. falciparum* es bastante reducido (n=6), por lo que no ha sido posible un análisis robusto.

Por último, en este estudio se reporta por primera vez la evaluación de PvMSP8 y PfRH2B como marcadores de seroprevalencia en la Amazonía peruana. Los niveles de la respuesta de anticuerpos IgG para PvMSP8 en la comunidad de Cahuilde, en donde la transmisión es baja y heterogénea se vio, una asociación con edad, sexo e infecciones previas, lo que también podría estar indicando que los títulos de anticuerpos hacia este antígeno podrían ser consecuencia de una infección recurrente producto de la exposición ligada a las actividades socioecómicas. La necesidad de una exposición acumulada para la mantención

de títulos de anticuerpos también nos podría estar demostrando que los anticuerpos generados hacia estas proteínas podrían ser de vida corta o mediana (Greenhouse *et al.*, 2019), y que sería necesario múltiples infecciones para poder mantenerse.

Hasta la fecha, son pocos los estudios que abordan la respuesta humoral generada por PvMSP8. En un estudio realizado por Cheng *et al.* se reportó que esta proteína fue capaz de diferenciar individuos con infección activa de controles sanos, y que los títulos de anticuerpos se mantenían hasta los 21 días luego de la infección y disminuyendo a partir del mes. Esto nos podría indicar que esta proteína podría servir como marcador de exposición reciente a *P. vivax*. De ser así, PvMSP8 podría ser útil como marcadores serológicos para el monitoreo de “hotspot” de transmisión remanentes en un contexto de programas de control de la malaria. Sin embargo, se necesitaría más estudios para determinar la cinética de los anticuerpos en pacientes de la Amazonía peruana.

Ya que la seroprevalencia tiende a incrementarse con la edad como resultado de una respuesta inmune aumentada contra los patógenos, exactamente lo que reflejan nuestros resultados, se podrían construir diferentes modelos estocásticos para el análisis de los datos utilizando la edad en relación al tiempo de exposición (Sepúlveda *et al.*, 2015). De esta manera, nuestros resultados abren paso a la posibilidad de continuar con el uso de estas proteínas como marcadores de seroprevalencia de malaria en nuestra región utilizando

modelamiento matemático para obtener información más robusta de la dinámica de transmisión de esta enfermedad en la Amazonía peruana.

9. CONCLUSIONES

- Las proteínas del estadio asexual PvMSP8 de *P. vivax* y PfrRH2B de *P. falciparum* fueron expresadas exitosamente en el sistema Baculovirus y reconocidas por anticuerpos de tipo IgG de suero de pacientes con infección activa con *P. vivax* y *P. falciparum*
- Se observaron diferencias significativas entre pacientes expuestos y no expuestos a *P. vivax* en los títulos de IgG específicos a PvMSP8 y PvMSP10 en ambas comunidades ($p < 0.005$). Para los pacientes expuestos a *P. falciparum*, solo se observaron diferencias significativas con PfMSP10 en la comunidad de Lupuna ($p < 0.05$).
- Los títulos altos de IgG específicos a PvMSP8, PvMSP10, PfMSP10 y PfrRH2B estuvieron asociados a la edad de los pacientes ($p < 0.001$) sin importar el estado de exposición y el contexto de transmisión. Con estos resultados se puede pensar que estos antígenos son capaces de generar una respuesta inmune de memoria, teniendo en cuenta la edad como una función de tiempo de exposición acumulativa al parásito,
- En un contexto de baja transmisión (comunidad de Cahuide), los títulos de IgG específicos a PvMSP10 y PvMSP8, se vieron asociados a infecciones previas ($p < 0.005$ y $p < 0.001$, respectivamente), por lo que sería necesaria una exposición recurrente a *P. vivax* para poder mantenerlos. De ser así, ambas proteínas podrían ser útiles como marcadores serológicos para estimar la transmisión de malaria.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Barfod L, Bernasconi NL, Dahlback M, Jarrossay D, Andersen PH, Salanti A, Ofori MF, Turner L, Resende M, Nielsen MA, Theander TG, Sallusto F, Lanzavecchia A, Hviid L. Human pregnancy-associated malaria-specific B cells target polymorphic, conformational epitopes in VAR2CSA. *Mol Microbiol.* 2007;63:335–347. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05503.
2. Birkholtz L-M, Blatch G, Coetzer TL, et al. Heterologous expression of plasmodial proteins for structural studies and functional annotation. *Malaria Journal.* 2008;7:197. doi:10.1186/1475-2875-7-197.
3. Black CG, Wang L, Wu T, Coppel RL. Apical location of a novel EGF-like domain-containing protein of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology.* 2003;127(1):59-68
4. Boyle MJ, Langer C, Chan JA, Hodder AN, Coppel RL, Anders RF, Beeson JG. Sequential processing of merozoite surface proteins during and after erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun.* 2014 Mar;82(3):924-36. doi: 10.1128/IAI.00866-13. Epub 2013 Nov 11. PubMed PMID: 24218484; PubMed Central PMCID: PMC3958018.
5. Chen JH, Jung JW, Wang Y, Ha KS, Lu F, Lim CS, Takeo S, Tsuboi T, Han ET. Immunoproteomics profiling of blood stage *Plasmodium vivax* infection by high-throughput screening assays. *J Proteome Res.* 2010 Dec 3;9(12):6479-89. doi: 10.1021/pr100705g. Epub 2010 Nov 4. PubMed PMID: 20949973.
6. Cheng Y, Wang B, Changrob S, et al. Naturally acquired humoral and cellular immune responses to *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 8 in patients with *P. vivax* infection. *Malaria Journal.* 2017;16:211. doi:10.1186/s12936-017-1837-5.

7. Cheng Y, Wang B, Sattabongkot J, Lim CS, Tsuboi T, Han E-T. Immunogenicity and antigenicity of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 10. *Parasitol Res.* julio de 2014;113(7):2559-68.
8. Chitarra V, Holm I, Bentley GA, Pêtres S, Longacre S. The crystal structure of C-terminal merozoite surface protein 1 at 1.8 Å resolution, a highly protective malaria vaccine candidate. *Mol Cell.* 1999 Apr;3(4):457-64. PubMed PMID: 10230398.
9. Chuquiyaury R, Molina DM, Moss EL, Wang R, Gardner MJ, Brouwer KC, Torres S, Gilman RH, Llanos-Cuentas A, Neafsey DE, Felgner P, Liang X, Vinetz JM. Genome-Scale Protein Microarray Comparison of Human Antibody Responses in *Plasmodium vivax* Relapse and Reinfection. *Am J Trop Med Hyg.* 2015 Oct;93(4):801-9. doi: 10.4269/ajtmh.15-0232. Epub 2015 Jul 6. PubMed PMID: 26149860; PubMed Central PMCID: PMC4596603.
10. Clark EH, Silva CJ, Weiss GE, Li S, Padilla C, Crompton PD, Hernandez JN, Branch OH. *Plasmodium falciparum* malaria in the Peruvian Amazon, a region of low transmission, is associated with immunologic memory. *Infect Immun.* 2012 Apr;80(4):1583-92. doi: 10.1128/IAI.05961-11. Epub 2012 Jan 17. PubMed PMID: 22252876; PubMed Central PMCID: PMC3318420.
11. Corran P, Coleman P, Riley E, Drakeley C: Serology: a robust indicator of malaria transmission intensity? *Trends Parasitol* 2007, 23:575-82.
12. Corran P, Coleman P, Riley E, Drakeley C. Serology: a robust indicator of malaria transmission intensity? *Trends Parasitol.* 2007;23:575–82. doi: 10.1016/j.pt.2007.08.023
13. Crompton PD, Kayala MA, Traore B, Kayentao K, Ongoiba A, Weiss GE, Molina DM, Burk CR, Waisberg M, Jasinskas A, Tan X, Doumbo S, Doumtabe D, Kone Y, Narum DL, Liang X, Doumbo OK, Miller LH, Doolan DL, Baldi P, Felgner PL, Pierce SK. A prospective analysis of the Ab response to *Plasmodium falciparum*

before and after a malaria season by protein microarray. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:6958–63. doi: 10.1073/pnas.1001323107

14. Dewasurendra RL, Dias JN, Sepulveda N, Gunawardena GS, Chandrasekharan N, Drakeley C, Karunaweera ND. Effectiveness of a serological tool to predict malaria transmission intensity in an elimination setting. *BMC Infect Dis*. 2017 Jan 9;17(1):49. doi: 10.1186/s12879-016-2164-0. PubMed PMID: 28068925; PubMed Central PMCID: PMC5223541.
15. Drakeley C, Cook J: Chapter 5. Potential contribution of sero-epidemiological analysis for monitoring malaria control and elimination: historical and current perspectives. *Adv Parasitol* 2009, 69:299-352.
16. Elliott SR, Fowkes FJ, Richards JS, Reiling L, Drew DR, Beeson JG. Research priorities for the development and implementation of serological tools for malaria surveillance. *F1000Prime Rep*. 2014 Nov 4;6:100. doi: 10.12703/P6-100. eCollection 2014. Review. PubMed PMID: 25580254; PubMed Central PMCID: PMC4229730.
17. Elshal, M. F., & McCoy, J. P. (2006). Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. *Methods*, 38(4), 317-323. doi:10.1016/j.ymeth.2005.11.010
18. Folegatti PM, Siqueira AM, Monteiro WM, Lacerda MV, Drakeley CJ, Braga ÉM. A systematic review on malaria sero-epidemiology studies in the Brazilian Amazon: insights into immunological markers for exposure and protection. *Malar J*. 2017 Mar 7;16(1):107. doi: 10.1186/s12936-017-1762-7. PubMed PMID: 28270152; PubMed Central PMCID: PMC5341168.
19. Fowkes FJI, Richards JS, Simpson JA, Beeson JG: The relationship between antimerozoite antibodies and incidence of *Plasmodium falciparum* malaria: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 2010, 7:e1000218. 63.

20. Garzón-Ospina D, Romero-Murillo L, Tobón LF, Patarroyo MA. Low genetic polymorphism of merozoite surface proteins 7 and 10 in Colombian *Plasmodium vivax* isolates. *Infect Genet Evol.* 2011 Mar;11(2):528-31. doi: 10.1016/j.meegid.2010.12.002. Epub 2010 Dec 21. PubMed PMID: 21182986.
21. Ghosh, A., Edwards, M. J., & Jacobs-Lorena, M. (2000). The journey of the malaria parasite in the mosquito: hopes for the new century. *Parasitol Today*, 16(5), 196-201.
22. Giraldo MA, Arevalo-Pinzon G, Rojas-Caraballo J, Mongui A, Rodriguez R, Patarroyo MA. Vaccination with recombinant *Plasmodium vivax* MSP-10 formulated in different adjuvants induces strong immunogenicity but no protection. *Vaccine.* 2009 Dec 10;28(1):7-13. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.09.046. Epub 2009 Sep 25. PubMed PMID: 19782110.
23. Greenhouse B, Daily J, Guinovart C, Goncalves B, Beeson J, Bell D, Chang MA, Cohen JM, Ding X, Domingo G, Eisele TP, Lammie PJ, Mayor A, Merienne N, Monteiro W, Painter J, Rodriguez I, White M, Drakeley C, Mueller I; Malaria Serology Convening. Priority use cases for antibody-detecting assays of recent malaria exposure as tools to achieve and sustain malaria elimination. *Gates Open Res.* 2019 Feb 12;3:131. doi: 10.12688/gatesopenres.12897.1. eCollection 2019. PubMed PMID: 31172051; PubMed Central PMCID: PMC6545519.
24. Hostetler JB, Sharma S, Bartholdson SJ, Wright GJ, Fairhurst RM, Rayner JC. A Library of *Plasmodium vivax* Recombinant Merozoite Proteins Reveals New Vaccine Candidates and Protein-Protein Interactions. Barry AE, ed. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2015;9(12):e0004264. doi:10.1371/journal.pntd.0004264.
25. Jarvis DL. Baculovirus-insect cell expression systems. *Methods Enzymol.* 2009;463:191-222. doi: 10.1016/S0076-6879(09)63014-7. Review. PubMed PMID: 19892174.

26. Jäschke A, Coulibaly B, Remarque EJ, Bujard H, Epp C. Merozoite Surface Protein 1 from *Plasmodium falciparum* Is a Major Target of Opsonizing Antibodies in Individuals with Acquired Immunity against Malaria. *Clin Vaccine Immunol*. 2017 Nov 6;24(11). pii: e00155-17. doi: 10.1128/CVI.00155-17. Print 2017 Nov. PubMed PMID: 28877929; PubMed Central PMCID: PMC5674199.
27. Joos C, Varela ML, Mbengue B, Mansourou A, Marrama L, Sokhna C, Tall A, Trape JF, Touré A, Mercereau-Puijalon O, Perraut R. Antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1p19 malaria vaccine candidate induce antibody-dependent respiratory burst in human neutrophils. *Malar J*. 2015 Oct 15;14:409. doi: 10.1186/s12936-015-0935-5. PubMed PMID: 26471813; PubMed Central PMCID: PMC4608189.
28. Kingsmore, S. F. (2006). Multiplexed protein measurement: technologies and applications of protein and antibody arrays. *Nat Rev Drug Discov*, 5(4), 310-320. doi:10.1038/nrd2006
29. Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature biotechnology*. 2005;23(5):567-575. doi:10.1038/nbt1095.
30. Leung WH, Meng ZQ, Hui G, Ho WK. Expression of an immunologically reactive merozoite surface protein (MSP-1(42)) in *E. coli*. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1675:62–70.
31. Life- Technologies. Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System. 2015
32. Lin CS, Uboldi AD, Marapana D, Czabotar PE, Epp C, Bujard H, Taylor NL, Perugini MA, Hodder AN, Cowman AF. The merozoite surface protein 1 complex is a platform for binding to human erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*. 2014 Sep 12;289(37):25655-69. doi: 10.1074/jbc.M114.586495. Epub 2014 Jul 29. PubMed PMID: 25074930; PubMed Central PMCID: PMC4162169.

33. Ly A, Hansen DS. Development of B Cell Memory in Malaria. *Front Immunol.* 2019 Apr 2;10:559. doi: 10.3389/fimmu.2019.00559. eCollection 2019. Review. PubMed PMID: 31001244; PubMed Central PMCID: PMC6454213.
34. Mangold KA, Manson RU, Koay ESC, Stephens L, Regner M, Thomson RB, et al. Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. *J Clin Microbiol.* 2005;43:2435–40.
35. Mehlin C, Boni E, Buckner FS, Engel L, Feist T, Gelb MH, et al. Heterologous expression of proteins from *Plasmodium falciparum*: results from 1000 genes. *Molecular and biochemical parasitology.* 2006;148(2):144-60.
36. Mehlin C, Boni E, Buckner FS, Engel L, Feist T, Gelb MH, Haji L, Kim D, Liu C, Mueller N, Myler PJ, Reddy JT, Sampson JN, Subramanian E, Van Voorhis WC, Worthey E, Zucker F, Hol WG. Heterologous expression of proteins from *Plasmodium falciparum*: results from 1000 genes. *Mol Biochem Parasitol.* 2006 Aug;148(2):144-60. Epub 2006 Apr 18. PubMed PMID: 16644028.
37. MJ B, AA H. Use of a recombinant Baculovirus product to measure naturally-acquired human antibodies to disulphide-constrained epitopes on the *P. falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP1). *FEMS Immunol Med Microbiol* 1993;6(4):307-15.
38. Moncunill, G., Campo, J. J., & Dobano, C. (2014). Quantification of multiple cytokines and chemokines using cytometric bead arrays. *Methods Mol Biol*, 1172, 65-86. doi:10.1007/978-1-4939-0928-5_6
39. Moreno M, Saavedra MP, Bickersmith SA, et al. Implications for changes in *Anopheles darlingi* biting behaviour in three communities in the peri-Iquitos region of Amazonian Peru. *Malar J.* 2015;14:290. Published 2015 Jul 30. doi:10.1186/s12936-015-0804-2

40. Mueller, I., Galinski, M. R., Baird, J. K., Carlton, J. M., Kochar, D. K., Alonso, P. L., & del Portillo, H. A. (2009). Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis*, 9(9), 555-566. doi:10.1016/S1473-3099(09)70177-X
41. Noland GS, Jansen P, Vulule JM, Park GS, Ondigo BN, Kazura JW, Moormann AM, John CC. Effect of transmission intensity and age on subclass antibody responses to *Plasmodium falciparum* pre-erythrocytic and blood-stage antigens. *Acta Trop*. 2015 Feb;142:47-56. doi: 10.1016/j.actatropica.2014.10.011. Epub 2014 Oct 24. PubMed PMID: 25446174; PubMed Central PMCID: PMC4277715.
42. Orlandi-Pradines E, Penhoat K, Durand C, Pons C, Bay C, Pradines B, Fusai T, Josse R, Dubrous P, Meynard J-B, Durand J-P, Migliani R, Boutin J-P, Druilhe P, Rogier C: Antibody Responses to Several Malaria Pre-Erythrocytic Antigens as a Marker of Malaria Exposure Among Travelers. *Am J Trop Med Hyg* 2006, 74:979–985.
43. Pacheco MA, Elango AP, Rahman AA, Fisher D, Collins WE, Barnwell JW, et al. Evidence of purifying selection on merozoite surface protein 8 (MSP8) and 10 (MSP10) in *Plasmodium* spp. *Infect Genet Evol*. julio de 2012;12(5):978-86.
44. Pan W, Ravot E, Tolle R, Frank R, Mosbach R, Turbachova I, et al. Vaccine candidate MSP-1 from *Plasmodium falciparum*: a redesigned 4917 bp polynucleotide enables synthesis and isolation of full-length protein from *Escherichia coli* and mammalian cells. *Nucleic acids research*. 1999;27(4):1094-103
45. Perez-Leal O, Sierra AY, Barrero CA, Moncada C, Martinez P, Cortes J, Lopez Y, Salazar LM, Hoebeke J, Patarroyo MA. Identifying and characterising the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 10 *Plasmodium vivax*

- homologue. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Jun 17;331(4):1178-84. PubMed PMID: 15883000.
46. Perraut R, Joos C, Sokhna C, et al. Association of antibody responses to the conserved *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 5 with protection against clinical malaria. *PLoS One*. 2014;9(7):e101737. Published 2014 Jul 21. doi:10.1371/journal.pone.0101737
 47. Perraut R, Varela ML, Joos C, Diouf B, Sokhna C, Mbengue B, Tall A, Loucoubar C, Touré A, Mercereau-Puijalon O. Association of antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-4 with protection against clinical malaria. *Vaccine*. 2017 Dec 4;35(48 Pt B):6720-6726. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.10.012. Epub 2017 Oct 15. PubMed PMID: 29042203.
 48. Pizarro JC, Chitarra V, Verger D, Holm I, Pêtres S, Dartevelle S, Nato F, Longacre S, Bentley GA. Crystal structure of a Fab complex formed with PfMSP1-19, the C-terminal fragment of merozoite surface protein 1 from *Plasmodium falciparum*: a malaria vaccine candidate. *J Mol Biol*. 2003 May 16;328(5):1091-103. PubMed PMID: 12729744.
 49. Red Nacional de Epidemiología (RENACE). Casos de Malaria por departamentos. Perú (2018). DGE – MINSA.
 50. Riccio E, Totino P, Pratt-Riccio L, Ennes-Vidal V, Soares I, Rodrigues M et al. Cellular and humoral immune responses against the *Plasmodium vivax* MSP-1₁₉ malaria vaccine candidate in individuals living in an endemic area in north-eastern Amazon region of Brazil. *Malar J*. 2013;12(1):326
 51. Rodrigues MH, Cunha MG, Machado RL, Ferreira OC, Rodrigues MM, Soares IS. Serological detection of *Plasmodium vivax* malaria using recombinant proteins corresponding to the 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1. *Malar J*. 2003;2(1):39. Published 2003 Nov 14. doi:10.1186/1475-2875-2-39

52. Rosas-Aguirre A, Speybroeck N, Llanos-Cuentas A, Rosanas-Urgell A, Carrasco-Escobar G, Rodriguez H, Gamboa D, Contreras-Mancilla J, Alava F, Soares IS, Remarque E, D Alessandro U, Erhart A. Hotspots of Malaria Transmission in the Peruvian Amazon: Rapid Assessment through a Parasitological and Serological Survey. *PLoS One*. 2015 Sep 10;10(9):e0137458. doi: 10.1371/journal.pone.0137458. eCollection 2015. PubMed PMID: 26356311; PubMed Central PMCID: PMC4565712.
53. Salavatifar M, Zakeri S, Hayati Roodbari N, Djadid ND. High-Level Expression, Purification and Characterization of A Recombinant *Plasmodium vivax* Apical Membrane Antigen 1: Implication for vivax Malaria Vaccine Development. *Cell J*. 2015 Fall;17(3):520-31. Epub 2015 Oct 7. PubMed PMID: 26464824; PubMed Central PMCID: PMC4601873.
54. Sepúlveda N, Stresman G, White MT, Drakeley CJ. Current Mathematical Models for Analyzing Anti-Malarial Antibody Data with an Eye to Malaria Elimination and Eradication. *J Immunol Res*. 2015;2015:738030. doi: 10.1155/2015/738030. Epub 2015 Dec 6. Review. PubMed PMID: 26770994; PubMed Central PMCID: PMC4684866.
55. Stewart L, Gosling R, Griffin J, Gesase S, Campo J, Hashim R, Masika P, Mosha J, Bousema T, Shekalaghe S, Cook J, Corran P, Ghani A, Riley EM, Drakeley C. Rapid assessment of malaria transmission using age-specific sero-conversion rates. *PLoS ONE*. 2009;4:e6083. doi: 10.1371/journal.pone.0006083.
56. Sturrock HJW, Hsiang MS, Cohen JM, et al. Targeting Asymptomatic Malaria Infections: Active Surveillance in Control and Elimination. *PLoS Medicine*. 2013;10(6):e1001467. doi:10.1371/journal.pmed.1001467.
57. Takem EN, Affara M, Amambua-Ngwa A, Okebe J, Ceesay SJ, Jawara M, Oriero E, Nwakanma D, Pinder M, Clifford C, Taal M, Sowe M, Suso P, Mendy A, Mbaye A, Drakeley C, D'Alessandro U: Detecting Foci of Malaria Transmission with

- School Surveys: A Pilot Study in the Gambia. *PloS One* 2013, 8:e67108. 65. Kim S, Ahn H-J, Kim T-S, Nam H-W: ELISA detection of vivax malaria with recombinant multiple stage-specific antigens and its ap
- 58.** Tham, W. H., Healer, J., & Cowman, A. F. (2012). Erythrocyte and reticulocyte binding-like proteins of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol*, 28(1), 23-30. doi:10.1016/j.pt.2011.10.002
- 59.** Torres KJ, Castrillon CE, Moss EL, Saito M, Tenorio R, Molina DM, Davies H, Neafsey DE, Felgner P, Vinetz JM, Gamboa D. Genome-level determination of *Plasmodium falciparum* blood-stage targets of malarial clinical immunity in the Peruvian Amazon. *J Infect Dis.* 2015 Apr 15;211(8):1342-51. doi: 10.1093/infdis/jiu614. Epub 2014 Nov 7. PubMed PMID: 25381370; PubMed Central PMCID: PMC4402338.
- 60.** Torres KJ, Clark EH, Hernandez JN, Soto-Cornejo KE, Gamboa D, Branch OH: Antibody response dynamics to the *Plasmodium falciparum* conserved vaccine candidate antigen, merozoite surface protein-1 C-terminal 19kD (MSP1-19kD), in Peruvians exposed to hypoendemic malaria transmission. *Malar J* 2008, 7:173.
- 61.** Triglia T, Chen L, Lopaticki S, Dekiwadia C, Riglar DT, Hodder AN, Ralph SA, Baum J, Cowman AF. *Plasmodium falciparum* merozoite invasion is inhibited by antibodies that target the PfRh2a and b binding domains. *PLoS Pathog.* 2011 Jun;7(6):e1002075. doi: 10.1371/journal.ppat.1002075. Epub 2011 Jun 16. PubMed PMID: 21698217; PubMed Central PMCID: PMC3116812.
- 62.** Victor ME, Bengtsson A, Andersen G, Bengtsson D, Lusingu JP, Vestergaard LS, Arnot DE, Theander TG, Joergensen L, Jensen AT. Insect cells are superior to *Escherichia coli* in producing malaria proteins inducing IgG targeting PfEMP1 on infected erythrocytes. *Malar J.* 2010 Nov 15;9:325. doi: 10.1186/1475-2875-9-325. PubMed PMID: 21078147; PubMed Central PMCID: PMC2994891.

63. Villasis E, Lopez-Perez M, Torres K, Gamboa D, Neyra V, Bendezu J, Tricoche N, Lobo C, Vinetz JM, Lustigman S. Anti-Plasmodium falciparum invasion ligand antibodies in a low malaria transmission region, Loreto, Peru. *Malar J*. 2012 Oct 30;11:361. doi: 10.1186/1475-2875-11-361. PubMed PMID: 23110555; PubMed Central PMCID: PMC3544580.
64. Vinetz JM, Gilman RH. Asymptomatic Plasmodium parasitemia and the ecology of malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg*. 2002 Jun;66(6):639-40. PubMed PMID: 12224566
65. White, N. J., Pukrittayakamee, S., Hien, T. T., Faiz, M. A., Mokuolu, O. A., & Dondorp, A. M. (2014). Malaria. *Lancet*, 383(9918), 723-735. doi:10.1016/S0140-6736(13)60024-0
66. Woehlbier U, Epp C, Kauth CW, Lutz R, Long CA, Coulibaly B, Kouyaté B, Arevalo-Herrera M, Herrera S, Bujard H. Analysis of antibodies directed against merozoite surface protein 1 of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun*. 2006 Feb;74(2):1313-22. PubMed PMID: 16428781; PubMed Central PMCID: PMC1360310.
67. World Health Organization. 2015. *World malaria report*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.

11. ANEXOS

11.1 Transfección de las células de insecto Sf9 con los b́acmidos recombinantes para las protéinas PvMSP8 y PfrH2B

Para cada protéina, se trabajó con las cantidades de b́acmido indicados en la tabla Anexo N°01, en un volumen final de 101µL.

Tabla Anexo N°01 . Volúmenes de ADN y medio para cada concentración evaluada

PvMSP8			
Concentraciones (µg)	Volumen de B́acmido (µL)	Volumen de Medio Sf900 (µL)	Volumen total (µL)
0.1	2.2	98.8	
0.5	11.1	89.9	
1	22.2	78.8	101
2	44.4	56.6	
3	66.6	34.4	
Concentraci3n inicial de b́acmido PvMSP8: 24 µg/mL			
PfrH2B			
Concentraciones (µg)	Volumen de B́acmido (µL)	Volumen de Medio Sf900 (µL)	Volumen total (µL)
0.1	2.9	98.1	
0.5	14.3	86.7	
1	28.6	72.4	101
2	57.1	43.9	
3	85.7	15.3	
Concentraci3n inicial de b́acmido PfrH2B: 35 µg/mL			

11.2 Determinación de secuencias para la síntesis de las proteínas

PvMSP8 y PfrH2B y diseño de Primers

Se definieron las siguientes secuencias para los genes de las proteínas

PfrH2B y PvMSP8:

pvmSP8:

>XM_001613135.1 Plasmodium vivax SaI-1 merozoite surface protein 8 partial mRNA

```
ATACATAATTTTGTAAATGAACGTCATTTTTAATTTTTATAT
CTGCTGCGTATATATATGTGCACATATATAGATAAGTATA
TATGTACTTAACATACGTATACGCTTTTATTTTTTAAGCCT
CCCCTTTTTTCGCATTTTGAACCTCCCCAGAGAGGAGCCAA
CTTGCGCTTACTGGGCCCTTTTGTGGAGCACTGCGTACATT
GATAATTGTATGTAAGCATTGTACATGTACCGTCTGCGC
GAGCCACCCAGCAAATTCGATACAGTATTAATAAAAAAAAA
AAATTCGCAGTTTTACCCCTAAGGTAAAAATCGGTACTCT
ATTTTACCCATTACGCTATCGCCTTGTATCTTCAAACCGA
AGCAACAATGAGGAAAAACGCGCAAATAGTAATTTTCTGC
CTGTTCCGGATTGCTGAGTTATAGATGCGGAGCTGAAGGAA
ACGTTAGCCCACCCAACCTTAATGACAACAGGGTAAACGG
CAACAATGGAAATAAAGGCAACGGAAATGACAACGACGT
GCCGTCGTTTATTGGAGGAAACAATAAACGTGAACGGC
AATAATGATGATAACATTTTTAATAAAAAATGGAAAGGATG
TCACCCGAAATGATGGCGATGCAAAGGATGGAGAAAATC
GAAATAACAAGAAAAACGAAAATGGCAGTGGCTCCAATG
AGAATAACTCCATTGCAAATGCGGACAATGGTAGCGGCA
AATCTGATGCGAATGCCAACCAAATTGATGAGGATGGAA
ATAAAATGGATGAAGCATCTTTAAAGAAAATCCTCAAAT
TGTAGACGAAATGGAAAATATTCAAGGACTGCTCGATGGA
GATTACAGCATTTTGGATAAGTACAGTGTCAAATTAGTTG
ATGAAGATGATGGAGAAACGAATAAAAGAAAAATCATTG
GAGAATATGATTTGAAAATGTTAAAAAATATTTTATTGTT
CAGAGAAAAAATTTCCCGAGTTTGTGAAAATAAATAACAAT
AAAAATTTACCCGTCTTGTTAAAAAATGCTCAAATGTGG
ATGACCCCAAAGATTTTGTGGTAGGTTTGTGGAAGATT
TATTTGAGAAAATTAATGAACATTTTATTAAGACGATTC
ATTTGATTTGAGTGACTATTTAGCCGATTTTCGAGCTCATCA
ATTATATAATTATGCACGAAACGTCCGAATTGATCGATGA
GCTTTTGAACATAATAGAGTCCATGAATTTTCAGATTGGAA
TCCGGATCTTTGGAGAAAATGGTTAAATCTGCAGAATCAG
GAATGAACTTAAATTGCAAATGAAGGAAGACATAATTC
```

ACTTACTTAAGAAATCCTCCGCCAAATTTTTTAAAATCGA
AATTGACAGAAAGACCAAGATGATATACCCAGTGCAGGC
TACACACAAAGGTGCCAACATGAAACAACCTCGCCCTGAGC
TTCCTCCAGAAGAACAATGTATGTGAACATAAAAAGTGCC
CATTGAACTCCAACCTGCTATGTTATAAATGGAGAGGAGGT
CTGCAGATGTCTACCCGGATTTAGCGACGTCAAATTGAT
AACGTGATGAACTGCGTTAGGGATGATACCCTTGACTGTA
GCAACAACAACGGTGGCTGTGATGTGAACGCAACGTGTAC
CCTTATAGACAAAAAATTGTGTGTGAATGCAAGGACAAC
TTTGAGGGAGACGGAATATACTGCTCCTACAGCATTTTCA
ACTCCATCAACAATTTTCAATTTTCTGATCTTGTTGCTTTTGT
G CCTGTACCTGTTCTAG

pfrh2b

>XM_024473230.1 Plasmodium falciparum 3D7 reticulocyte binding protein 2 homologue b (PF3D7_1335300), partial Mrna

GAATTCGGCATGAATGAAACGAAAAGAATATCAAACACGGATG
CATATACTAATATAACTCTCCAGGATATTGAAAATAATAAAAAT
AAAGAAAATAATAATATGAATATTGAAACAATTGATAAATTAA
TAGATCATATAAAAATACATAATGAAAAAATACAAGCAGAAAT
ATTAATAATTGATGATGCCAAAAGAAAAGTAAAGGAAATAACA
GATAATATTAACAAGGCTTTTAATGAAATTACAGAAAATTATAA
TAATGAAAATAATGGGGTAATTAATCTGCAAAAAATATTGTC
GATAAAGCTACTTATTTAAATAATGAATTAGATAAATTTTTATT
GAAATTGAATGAATTATTAAGTCATAATAATAATGATATAAAG
GATCTTGGTGATGAAAATTAATATTAAGAAGAAGAAGAAA
GAAAAGAAAGAGAAAGATTGGAAAAGCGAAACAAGAAGAAG
AAAGAAAAGAGAGAGAAAGAATAGAAAAGAAAACAAGAG
AAAGAAAGACTGGAAAGAGAGAAACAAGAACAACACTAAAAAAA
GAAGCATTAAAAAACAAGAGCAAGAAAGACAAGAACAACAA
CAAAAAGAAGAAGCATTAAAAAGACAAGAACAAGAACGACTA
CAAAAAGAAGAAGAATTAAAAAGACAAGAGCAAGAAAGGCTG
GAAAGAGAGAAACAAGAACAACACTACAAAAGAAGAAGAATTA
AGAAAAAAGAGCAGGAAAAACAACAACAAGAAATATCCAA
GAATTAGAAGAGCAAAAAAAGCCTGAAATAATAAATGAAGCAT
TGGTAAAGGGGGATAAAATACTAGAAGGAAGTGATCAGAGAA
ATATGGAATTAAGCAAACCTAACGTTAGTATGGATAATACTAAT
AATAGTCCAATTAGTAACAGTGAAATTACAGAAAGCGATGATA
TTGATAACAGTGAAAATATACATACTAGTCATATGAGTGACATC
GAAAGTACACAACTAGTCATAGAAGTAACACCCATGGGCAAC
AAATCAGTGATATTGTTGAAGATCAAATTACACATCCTAGTAAT
ATTGGAGGAGAAAAAATTACTCATAATGATGAAATTTCAATCA
CTGGTGAAGAAATAACATTAGCGATGTTAATGATTATAGTGA

AAGTAGCAACATATTTGAAAATGGTGACAGTACTATAAATACC
AGTACAAGAAACACGTCTAGTACACATGATGAATCCCATATAA
GTCCTATCAGCAATGCGTATGATCATGTTGTTTCAGATAATAAA
AAAAGTATGGATGAAAACATAAAAGATAAATTAAGATAGATG
AAAGTATAACTACAGATGAACAAATAAGATTAGATGATAATTC
TAATATTGTTAGAATTGATAGTACTGACCAACGTGATGCTAGTA
GTCATGGTAGTAGTAATAGGGATGATGATGAAATAAGTCATGT
TGGTAGCGACATTCATATGGATAGTGTTGATATTCATGATAGTA
TTGACACTGATGAAAATGCTGATCACAGACATAATGTAACTCT
GTTGATAGTCTTAGTTCTAGTGATTACACTGATACACAGAAAGA
CTTTAGTAGTATTATTAAGATGGGGGAAATAAAGAAGGACAT
GCTGAGAATGAATCTAAAGAATATGAATCCCAAACAGAACAAA
CACATGAAGAAGGAATTATGAATCCAAATAAATATTCAATTAG
TGAAGTTGATGGTATTAAATTAATGAAGAAGCTAAACATAAA
ATTACAGAAAACTGGTAGATATCTATCCTTCTACATATAGAAC
ACTTGATGAACCTATGGAAACACATGGTCCAAATGAAAAATTT
CATATGTTTGGTAGTCCATATGTAACAGAAGAAGATTACACGG
AAAAACATGATTATGATAAGCATGAAGATTTCAATAATGAAAG
GTATTCAAACCATAACAAAATGGATGATGGCCATCATCACCATC
ACCACTAGAAGCTT